

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E.A.P. DE CIENCIAS BIOLOGICAS**

**Estudio de las Mixobacterias en suelos de Lima**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en Microbiología  
y Parasitología

**AUTOR**

**Braulio Napoleón Díaz Solano**

**ASESOR**

**Mag. Débora Elizabeth Alvarado Iparraguirre**

**Lima – Perú**

**2012**

## **DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo no habría sido posible sin el asesoramiento y colaboración de la Dra Juana María Cocha y la Mag. Débora Alvarado Iparraguirre, quienes en todo momento me brindaron con generosidad la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la concreción de la presente tesis.

Al igual quiero dejar constancia de mi agradecimiento a los miembros del Jurado: Dr. Pedro Castellanos, Mag. Ruth García de la Guarda y Mag. Mery Suni de los cuales recibí sus sugerencias en la corrección, de forma ardua y minuciosa, de mi presente trabajo de investigación, ayudando con su aporte la posibilidad de mejorarlo y así llegar a un feliz término.

A mis padres Rosario Díaz y Antonia Solano los que junto a mi familia me dieron en todo momento su apoyo incondicional en dosis elevadas que permitieron darme fuerza y aliento para cumplir esta tarea.

A mí querida esposa Liliana y mis hijos Selene y Rodrigo que son la nueva fuerza que Dios me ha dado en la guía de mis actuales pasos.

No sería justo terminar los agradecimientos sin recordar los momentos vividos en la Facultad de Ciencias Biológicas, lugar en donde adquirí muchos conocimientos que me encaminaron con éxito en mi vida profesional. A los docentes y compañeros con los cuales compartí esa bella época también les doy las gracias.

## ÍNDICE GENERAL

CAP.	Temas	Nro. Página
	Resumen y <i>Abstract</i>	
I	Introducción	1
II	Marco Teórico	4
	2.1 Taxonomía del grupo Myxobacteriales	4
	2.1.1. Fase vegetativa	10
	2.1.2. Fase quística	11
	2.2. Aislamiento y caracterización	14
III	Objetivos	17
IV	Material y métodos	18
	4.1. Material de laboratorio	
	4.1.1. Equipos	
	4.1.2. Medios de cultivo	
	4.1.3. Insumos	19
	4.1.4. Material de vidrio	
	4.1.5. Otros	20
	4.2. Métodos	20
	4.2.1. Muestreo	
	4.2.1.1. Muestra	
	4.2.1.2. Zonas de muestreo	
	5.2.1.3. Tipos de suelo	
	4.2.2. Colecta y transporte de las muestras	24
	4.2.3. Aislamiento de <i>Escherichia coli</i>	

	4.2.4. Procesamiento de las muestras de suelo	25
	4.2.5. Aislamiento primario de mixobacterias	
	4.2.5.1. Aislamiento de cepas proteolíticas	
	4.2.5.2. Aislamiento de cepas celulolíticas	
	4.2.6. Purificación de cepas	28
	4.2.7. Obtención de formas vegetativas de mixobacterias	31
	4.2.8. Identificación de cepas	32
	4.2.8.1. Cuerpos fructificantes	
	4.2.8.2. Mixosporas microquistes	
	4.2.8.3. Fase vegetativa	
	4.2.8.4. Clave de identificación	
	4.2.9. Otras pruebas de identificación utilizadas	38
	4.2.10. Mantenimiento y conservación de cepas	
V	Resultados	39
	5.1. Aislamiento primario	
	5.2. Purificación de cepas	44
	5.3. Obtención de formas vegetativas	51
	5.4. Identificación de cepas	57
VI	Discusión	60
VII	Conclusiones	65
VIII	Recomendaciones	66
IX	Referencias bibliográficas	67
X	Anexos	76
	Anexo A Medios de cultivo	
	Anexo B Fotos	80
	Anexo C Diagrama de flujo de la metodología utilizada	90

## RESUMEN

Se investigó la presencia de microorganismos del Orden Myxococcales en suelos representativos del Departamento de Lima como una contribución a los escasos trabajos realizados en referencia a este grupo microbiano con el fin de sentar las bases para futuros trabajos en el área biotecnológica. Para tal fin, se examinaron suelos de 6 lugares diferentes de Lima: Bosques de Zárate, Jardines de Lima, Lomas de Lachay, Lunahuaná-Cañete, Valle del Río Chillón y los Pantanos de Villa, colectándose un total de 114 muestras. Se utilizaron los medios Krzeminieska and Krzeminieska (K&K), el medio Singh (MSg) y agar pellets (A-P) para el aislamiento y purificación de cepas bacteriolíticas; el medio Stanier modificado (MSt) y el agar Stanier almidón (ASTA) para el aislamiento y purificación de cepas celulolíticas; los medios CT, agar Levadura (AL) y el medio IM-1 fueron utilizados para observar las formas vegetativas y fructificantes de los aislados. La identificación se realizó en base a la clasificación morfológica reportada en el Manual Bergey (Holt *et al.*, 1994). Se confirmó la presencia de Myxococcales en suelos de Lima, siendo las cepas bacteriolíticas del género *Myxococcus* las más predominantes. También se identificaron cepas de los géneros *Angiococcus*, *Archangium*, *Cystobacter*, *Sorangium* y *Stigmatella*. La identificación basada en características morfológicas, fue la de mayor utilidad para la identificación de Myxococcales aún cuando pruebas adicionales ayudaron en la identificación de las especies.

## **ABSTRACT**

*We investigated the presence of microorganisms in soils representative Myxococcales Order of the Department of Lima as a contribution to the limited work done in reference to this microbial group in order to provide the basis for future work in biotechnology. To this purpose, we examined soils from 6 different places in Lima: Forests of Zárate, Gardens of Lima, Lomas de Lachay Lunahuaná-Cañete, Chillón River Valley and the Villa Wetlands, collecting a total of 114 samples. Were used media Krzeminieska and Krzeminieska (K & K), the Singh medium (MSg) and agar pellet (AP) for the isolation and purification of strains bacteriolytic; the Stanier medium modified (SDM) and the agar Stanier starch (ASTA) for isolation and purification of cellulolytic strains, CT media, agar yeast (AL) and the IM-1 medium were used to observe vegetative and fruiting forms of the isolates. The identification was made based on morphological classification reported in Bergey's Manual (Holt et al., 1994). We confirmed the presence of Myxococcales in soils of Lima, with bacteriolytic strains of the genus Myxococcus the most predominant. We also identified strains of the genera Angiococcus, Archangium, Cystobacter, Sorangium and Stigmatella. Identification based on morphological characteristics was the most useful for identification of Myxococcales, even when additional tests aided in identifying the species.*

## I. INTRODUCCIÓN

La búsqueda de nuevas sustancias benéficas, siempre ha sido una constante durante la vida del hombre; usados para ir cubriendo sus necesidades de alimentación, salud, ambiente, entre otros. Los microorganismos son actualmente muy utilizados con fines biotecnológicos debido a los factores que favorecen su empleo, como su facilidad de manipulación y sus cortos periodos de vida, que han permitido considerarlos como una buena fuente de productos útiles para el hombre.

La necesidad de aislar nuevos productos metabólicos que contribuyan a solucionar problemas, ha puesto al grupo de las Myxobacterias, como fuente inapreciable de nuevos productos activos.

Las Myxobacterias, actualmente ubicadas dentro del Orden Myxococcales en el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (Garrity *et al.*, 2004), reúne a un conjunto de géneros con características especiales que los diferencia del resto de las bacterias. En general presentan 3 características que los distinguen dentro de los procariotes, a saber:

- (i) El complejo ciclo de vida (Wireman & Dworkin, 1979; Sozinova, et al, 2005), que consiste en la agregación intercelular, agregación y formación de cuerpos fructificantes, dentro de ellos mismos;
- (ii) Presentan movimiento deslizante
- (iii) Hidrolizan macromoléculas extracelulares que utilizan como productos para su crecimiento.

Es precisamente esta última característica la que hace a este grupo sumamente interesante y por la cual viene siendo investigado desde muchos años atrás sobre todo en países industrializados como un agente potencial de aplicabilidad en agricultura, industria farmacéutica, medicina, entre otros campos. Estas bacterias se presentan como una fuente alternativa de nuevos antibióticos y minerales como fosfatos, carbonatos sulfatos o incluso cuarzo (Reichenbach y col, 1988).

Es así que se han aislado diversos componentes a partir de este grupo microbiano, tales como *Auranchin* A, B, C y D (Kunze *et al.*, 1987), *Corallopin* A, B y C (Rolf *et al.*, 1985), *Megovalicins* A, B, C, D, G y H (Miyashiro *et al.*, 1988), el *Myxovaligina* (Irichk *et al.*, 1983), *Nannochelins* A, B y C (Kunze *et al.*, 1992), otros de actividad antifúngica como los *Soraphens* entre otros (Gerth *et al.*, 1994; Daoud & Foster, 1993), feromonas como la *Stignolone* (Hull *et al.*, 1988). También se han detectado metabolitos con actividad insecticida (Sehdev & Dhala, 1992). Por lo tanto es necesario evaluar si estos organismos están presentes en suelos de Lima para así poder purificar e industrializar sus metabolitos y de esta manera poder contar con una industria propia que sirva de alternativa para el crecimiento económico del país. Cabe resaltar, además, el rol ecológico de este grupo microbiano en la naturaleza, su actuación como predador aeróbico, comportándose como **carroñero** de otros microorganismos (Mc Vittie *et al.*, 1962).

Las investigaciones sobre este grupo bacteriano se han realizado desde unas décadas atrás en muchos países, incidiéndose inicialmente en temas tales como: aislamiento, cuantificación, caracterización, taxonomía. Pero en estas últimas 3 décadas se ha profundizado el estudio en relación a la elaboración de diversos productos activos, sobre todo a nivel fisiológico, genético y molecular como el uso de la secuenciación de ADN y métodos de amplificación mediante la técnica de PCR para establecer comparaciones con las secuencias de otros organismos conocidos (Martin *et al.*, 2006).

En nuestro medio es escasa la literatura producida, puesto que hasta el momento sólo se ha realizado una evaluación de la metodología de aislamiento para este grupo microbiano con un número restringido de muestras (Ramírez, 1991), por lo que se hace necesario conocer en una primera etapa la frecuencia en la que se presentan las especies de este grupo microbiano en los diversos tipos de suelos, para después determinar la capacidad de los aislados para producir enzimas, toxinas u otros metabolitos de interés, relacionándolos con los diversos factores que involucran su producción.



Por lo tanto este trabajo tiene la finalidad de sentar las bases para el conocimiento de las especies existentes de mixobacterias en diversos suelos de Lima y su relación con los diversos agentes biológicos, las propiedades biológicas de cada especie, rol ecológico y potenciales fuentes productoras de principios activos biológicos y bioquímicos.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. TAXONOMÍA DEL GRUPO MIXOBACTERIALES

Las mixobacterias pertenecen al Dominio Bacteria y se describen en el Manual de Bergey's para la Determinación Bacteriológica (Holt *et al.*, 1994) dentro del grupo 16, como bacterias fructificantes y deslizantes; en la segunda edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2001-2004) son ubicados en un único Orden dentro de las Delta Proteobacterias. Es importante diferenciar este grupo de microorganismos de los Myxomicetes, organismos eucarióticos mucilaginosos no endoparásitos que han sido ubicados recientemente dentro del Reino Protocista (Spiegel *et al.*, 2004).

Son organismos Gram negativos de forma bacilar, relativamente largos midiendo 0,6 – 1,2 por 3 –25  $\mu\text{m}$ , se les puede diferenciar en 2 grupos definidos de acuerdo a la morfología:

El primero, tiene forma de varillas delgadas flexibles que terminan en punta y comprenden los siguientes géneros:

- *Myxococcus*
- *Corallococcus*
- *Angiococcus*
- *Archangium*
- *Cystobacter*
- *Mellitangium*
- *Stigmatella*.

Y el otro grupo, son bacterias cilíndricas un poco robustas con puntos redondeados y comprenden a los géneros:

- *Haploangium*
- *Nannocystis*
- *Polyangium*
- *Sorangium*

- *Chondromyces*

Actualmente según la clasificación de la última edición del Manual Bergey's de Sistemática Bacteriológica (Garrity *et al.*, 2004) se les ha clasificado de la siguiente manera:

Dominio : Bacteria

Phylum : Proteobacteria

Clase : Deltaproteobacteria

Orden VII : Myxococcales

Suborden I : Cystobacterineae

Familia I : Cystobacterineae

Género I : *Cystobacter*

*Cystobacter furscus*

*Cystobacter armeniaca*

*Cystobacter badius*

*Cystobacter disciformis* (*Angiococcus disciformis*)

*Cystobacter ferrogineus*

*Cystobacter gracilis*

*Cystobacter miniatus*

*Cystobacter velatus*

*Cystobacter violaceus*

Género II : *Anaeromyxobacter*

*Anaeromyxobacter dehalogenans*

Género III : *Archangium*

*Archangium gephyra*

Género IV : *Hyalangium*

*Hyalangium minutum*

Género V : *Melittangium*

*Melittangium boletus*

*Melittangium alboraceum*

*Melittangium chenicola*

Género VI : *Stigmatella*

*Stigmatella aurantiaca*

*Stigmatella erecta*

*Stigmatella hybrida*

Familia II : *Myxococcacea*

Género I : *Myxococcus*

*Myxococcus fulvus*

*Myxococcus coralloides*

*Myxococcus disciformis*

*Myxococcus flavescens*

*Myxococcus macrosporum*

*Myxococcus stipitatus*

*Myxococcus virescens*

*Myxococcus xanthus*

Género II : *Corallococcus*

*Corallococcus coralloides*

*Corallococcus exiguus*

*Corallococcus macrosporus*

Género III : *Pyxicoccus*

*Pyxicoccus fallax*

Suborden II : Sorangineae

Familia I : Polyangium

Género I : *Polyangium*

*Polyangium vitellinum*

*Polyangium aureum*

*Polyangium cellulosum*

*Polyangium fumosum*

*Polyangium luteum*

*Polyangium minor*

*Polyangium parasiticum*

*Polyangium rugiseptum*

*Polyangium solediatum*

*Polyangium spumosum*

Género II : *Byssoplaga*

*Byssoplaga cruenta*

Género III : *Chondromyces*

*Chondromyces crocatus*

*Chondromyces apiculatus*

*Chondromyces catenulatus*

*Chondromyces lanuginosus*

*Chondromyces pediculatus*

*Chondromyces robustus*

Género IV : *Haploangium*

*Haploangium rugiseptum*

*Haploangium minus*

Género V : *Jahnia*

*Jahnia thaxteri*

Género VI : *Sorangium*

*Sorangium cellulosum*

Suborden III: Nannocystineae

Familia I : Nannocystaceae

Género I : *Nannocystis*

*Nannocystis exedens*

*Nannocystis pusilla*

Género II : *Plesiocystis*

*Plesiocystis pacifica*

Familia II : Haliangiaceae

Género I : *Haliangium*

*Haliangium ochraceum*

*Haliangium tepidum*

Familia III : Kofleriaceae

Género I : *Kofleria*

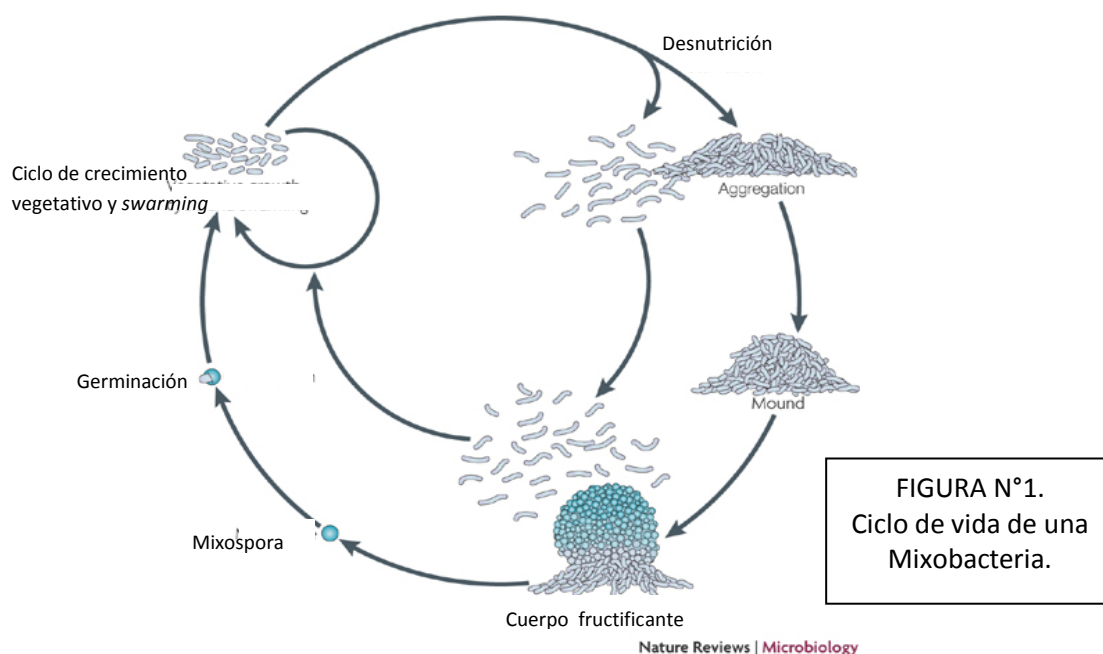
*Kofleria flava*

Estas bacterias presentan un movimiento deslizante a lo largo de interfases tales como el agar o superficies de vidrio, es así que pueden penetrar el sustrato y moverse a través de él, por ejemplo a través de un gel de agar al 1,2 – 1,5%.

Presentan 3 capacidades que los distingue dentro de los procariontes: (Wireman & Dworkin, 1979).

1. Movimiento deslizante en la fase vegetativa, en la cual forman una delgada capa que sirve de rastro para otras células, luego de lo cual cubren gradualmente la placa.
2. Tiene un sofisticado sistema de comunicación celular.
3. Muestran un notable potencial morfogenético, el cual es expresado en 2 niveles:
  - En un primer nivel, bajo condiciones adversas inducido por condiciones de inanición, producen un cuerpo fructificante en cooperación mediante una morfogénesis de  $10^5 - 10^6$  células; precisamente es esta característica la que los distingue de los demás procariontes;
  - Dentro del cuerpo fructificante, en un segundo nivel de morfogénesis celular, las restantes células vegetativas se transforman en estructuras denominadas MIXOSPORAS: una mixospora se define como una célula mixobacteriana en reposo, contenida en un cuerpo fructificante. Una mixospora contenida dentro de una cápsula dura, se denomina microquiste.

Podemos entonces decir que las mixobacterias presentan un ciclo de vida complejo (Reichenbach, 1999), pues presentan una **fase vegetativa** con presencia de nutrientes en el medio y un ciclo de desarrollo celular que se desencadena ante la carencia de nutrientes siendo denominado fase quística (Figura 1).



### 2.1.1. FASE VEGETATIVA

En esta fase la bacteria dispone de nutrientes por ello lo utiliza para su crecimiento y multiplicación celular, este crecimiento se manifiesta en la progresiva elongación de las células hasta que finalmente se produce la división celular por fisión binaria, incrementando el número de células, utilizando de este manera los nutrientes que le brinda el medio de manera similar al restos de las bacterias.

Durante el crecimiento vegetativo las células se mantienen unidas y se desplaza por deslizamiento en forma coordinada, formando agrupaciones denominadas enjambres, compuesta por miles de células asociadas entre si. En estas agrupaciones de enjambres las mixobacterias se nutren cooperativamente al inducir lisis en otras bacterias o levaduras siguiendo un comportamiento de microdepredación (Reichenbach *et al*, 1992).

Estos microorganismos son simples, no flageladas, deslizantes y obtienen sus compuestos alimenticios en forma primaria causando lisis en otras células merced a la liberación de exoenzimas al medio. Se ha comprobado que tienen los genomas más grandes de todas las bacterias que alcanzan entre 9500 – 10000 kbp y DNA con un alto contenido de G + C (66-72 mol %) (Reichenbach & Dworkin, 1992; Dworkin & Kaiser 1993; Dworkin 1996). Ha sido publicado el genoma de *Sorangium cellulosum* considerado el más grande genoma bacteriano conocido porque contiene un total de 13.0 millones de nucleótidos (Schneiker *et al.*, 2007).

Nutricionalmente se les puede diferenciar en dos grupos definidos: **Proteolíticos** y **celulolíticos**. El primer grupo está constituido por la mayoría de especies y se caracterizan por liberar enzimas hidrolíticas (proteasas, lipasas, y nucleasas), que actúan degradando a células vivas intactas como también células muertas. La colaboración del enjambre completo en la liberación de exoenzimas potencia la capacidad degradativa de este grupo de microorganismos, incrementando la eficiencia en la obtención de nutrientes (Rosenberg *et al.*, 1977). El otro grupo nutricional denominado **celulolíticos**,



está constituido por algunas especies del genero *Sorangium* los cuales liberan enzimas del tipo glucanasas que desdoblan la celulosa en moléculas digeribles por este grupo. Estas bacterias presentan un metabolismo aeróbico quimiorganotrofo empleando para su crecimiento aminoácidos como fuente de energía y carbono (Bretscher *et al.*, 1978). Estos aminoácidos son conseguidos mediante la hidrólisis de oligopéptidos liberados mediante la hidrólisis de proteínas mediadas por las proteasas secretadas por la bacteria es por ello que la caseína hidrolizada o peptona puede proporcionar estos nutrientes. Los carbohidratos de manera ordinaria en la forma de monosacáridos o disacáridos no son usados como fuente de energía aunque estimulan el crecimiento al ser empleadas como fuente de carbono (Reinchenbach., 2005). Las vitaminas en contadas ocasiones favorecen al crecimiento, como es el caso que la vitamina B12 (cianocobalamina). La incapacidad de utilizar carbohidratos refleja la carencia de ciertas enzimas del ciclo de Embden-Meyerhof. Los organismos son característicos por presentar un ciclo del ácido cítrico y sistema citocromo bien desarrollado.

Las mixobacterias en su fase vegetativa se especializan en la depredación de biomoléculas, matando a bacterias, hongos y otros microorganismos utilizando para ello un pequeño grupo de enzimas, que descompone la pared celular, celulosa entre otras estructuras antes de aprovecharse de los componentes celulares de estos organismos.. El ataque enzimático con que envisten es más eficiente en comunidad de trabajo ya que a altos niveles de concentración de enzimas su efecto no podrá ser rechazado y minimizado por difusión, aprovechando así una célula, de los esfuerzos hechos por otras y viceversa (Rosenberg *et al.*, 1977). Luego que empieza el agotamiento de nutrientes en el medio, empieza la otra fase de las mixobacterias.

#### **2.1.2. FASE QUÍSTICA**

Esta fase es inducida por la escasez de nutrientes en respuesta a la privación en el aporte de fuente de carbono, nitrógeno y fósforo y/o cambios abruptos en el medio que no les favorece. Esta carencia de nutrientes constituye el estímulo inductor que desencadena los eventos necesarios que conduce a la fase quística. La progresión hacia la fase quística requiere junto a la ausencia de nutrientes, la presencia de una elevada densidad celular para el intercambio de

señales entre las células y un sustrato sólido para el movimiento de las células por el desplazamiento (Kaiser, 2004).

El agotamiento de nutrientes en el medio es el desencadenante de esta fase de desarrollo de la mixobacteria pues ésta actúa como señal para que el conjunto de células de un enjambre empiecen a moverse a ciertos puntos denominados centros de agregación, en donde las células se apilan unas encima de otras. Estos centros de agregación, que en un principio son dinámicos se estabilizan y reclutan células adicionales para generar montículos que luego crecen para formar el **cuerpo fructificante**, éste varía desde la simple masa globular hasta formas complejas con una pared de cuerpo fructificante y un pedúnculo. La observación detenida de todas las características de un cuerpo fructificante sirve para identificar a estos organismos, tales como: color, forma, tamaño entre otros.

La formación de cuerpos fructificantes empieza como ya se dijo, por la reunión de células vegetativas que migran unas hacia otras para formar montículos. Durante su formación muchas células se sacrifican dentro del grupo, muriendo varias de ellas que vierten sus contenidos para conformar las paredes del cuerpo fructificante dando la oportunidad, de esta manera, a las células restantes a diferenciarse en formas de resistencia llamadas **mixosporas** que se reproducirán en el nuevo ciclo vegetativo cuando las condiciones lo favorezcan (Kaiser, 2004).

Este grupo tiene un comportamiento social interesante ya que incluyen tanto trampa como altruismo en su vida social, digieren y consumen a su presa en forma cooperativa; en épocas de escasez una minoría se transforma en mixosporas que protegen a otras estructuras adicionales (microquistes o microcistos), para soportar mejor las condiciones del medio. El cuerpo fructificante cuando encuentra condiciones favorables de vida, libera las mixosporas para dar lugar nuevamente a una fase vegetativa.

La fructificación también es explicable por la necesidad de vivir en comunidad, las mixosporas son resistentes a fuertes factores ambientales en mucha mayor medida que las células vegetativas pues resisten de 58 a 60 °C en una suspensión que asemeja a un cuerpo fructificante. Las células vegetativas mueren a 45°C. La mayoría mixobacterias no son halotolerantes aceptando

bajas concentraciones de sal, aunque unas pocas cepas se han aislado en ambientes marinos (Iizuka *et al.*, 1988).

La liofilización no es una buena práctica para su preservación puesto que las células vegetativas son sensibles a la desecación mientras que si lo es para las mixosporas que pueden ser almacenadas en un cuarto seco a baja temperatura, en cuerpos fructificantes o sobre papel filtro por 10-25 años. La deposición de trehalosa en las mixosporas es responsable de su resistencia a la desecación (Mc Bride & Zusman, 1989).

Las mixobacterias son aisladas preferentemente de suelos, también en menor escala de estiércol de animales como conejos, ovejas, aire contaminado (Wu *et al.*, 1968), en áreas nunca exploradas por el hombre como cuevas (Menne & Ruckert, 1988) e inexplicablemente fueron aislados de pantanos (6-8,7 pH) (Hook, 1977), también se han encontrado en agua, aunque se cree que es en forma accidental al entrar este elemento en contacto con el suelo. Habitan en un rango de temperatura de 28-34 °C y tardan de 4 a 14 días para dar origen a cada generación; aunque muchas cepas crecen de 38 a 40 °C es en forma más lenta (McCurdy, 1969, Gert *et al.*, 1994, unpublished data). Algunas cepas son psicrófilas creciendo de 4 a 8 °C (Zhukova, 1963; Menne & Ruckert, 1988 y observación personal).

Tradicionalmente se ha sugerido que este grupo microbiano, juega un rol importante en la ecología del suelo. Las mixobacterias excretan diversos productos químicos por varias razones, entre otras porque se comunican entre ellas ya sea por un medio mecánico (*pili*) o químico (feromonas), y son elaborados durante la formación del cuerpo fructificante (Stephens *et al.*, 1982; Hull *et al.*, 1988; Plaga *et al.*, 1998). Además secretan muchos metabolitos secundarios bioactivos (Reichenbach & Hofle, 1988), estos componentes se obtienen por raros mecanismos metabólicos, para este grupo se han reportado 18 nuevos transportadores de electrones; descubriéndose 8 componentes que interfieren con la actina y tubulina del citoesqueleto eucariótico usualmente con alta eficiencia (ej. disorazol a 1 pgmL<sup>-1</sup>) y 4 componentes que actúan a nivel de las polimerasas. La mayoría de estos componentes inhiben principalmente hongos y protozoarios competidores del hábitat.

Se han descubierto diminutos aparatos en la superficie de las células mixobacterianas, que consisten en diminutas argollas conectadas por cortos elementos longitudinales, éstos parecen ejecutar cambios conformacionales que pueden crear contracciones en forma de ondas en la superficie pudiendo representar la maquinaria de la movilidad deslizante (Lúnsdorf & Reichenbach, 1989; Freese *et al.*, 1997).

No se han reportado observaciones acerca de mixobacterias patógenas para el hombre, aún cuando todavía se sigue mencionando al grupo Cytophaga que es patógeno en peces pero este grupo bacteriano, con la reciente clasificación filogenética, constituye un orden aparte.

## **2.2. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN**

El aislamiento de este grupo microbiano, preferentemente se ha realizado a partir de suelos, si bien es cierto que se les ha encontrado escasamente en otros sustratos como madera descompuesta, estiércol, pantanos y agua. Es Taxter en 1892 que los describe por primera vez denominándolos microorganismos multicelulares, luego mas tarde Jahn elabora las primeras clasificaciones de este grupo (Wireman & Dworkin, 1979).

En 1926, Krzemieniewska y Krzemienniewska proponen una técnica de aislamiento de mixobacterias de naturaleza bacteriolítica a partir de suelos; esta técnica se denomina K&K y tradicionalmente es la más usada para un aislamiento primario por ser un medio de bajo costo, de fácil preparación y que además brinda los mejores resultados.

En 1936 se aislaron mixobacterias de naturaleza celulolíticas por Imschentsky & Solntzeva, encontrándose a la especie *Polyangyum cellulosum* que fue incluida en el Manual Bergey's en 1957; esta bacteria fue aislada utilizando el medio Winogradsky propuesto en 1929.

En 1941 Stanier propuso el método de aislamiento más satisfactorio para las formas celulolíticas, con el uso del medio Stanier en placas que es el medio Winogradsky.

Se le acuña el término de **microdepredadores** porque actúan, lisando a otras bacterias vivas o muertas (Singh, 1947). En 1947 Singh describe una técnica de aislamiento para mixobacterias de naturaleza bacteriolítica, empleando para esto, el medio agar Singh. La utilización de este método facilita su posterior purificación; reportándose un estimado de hasta  $2 \times 10^3$ - $7,6 \times 10^4$  microorganismos por gramo.

En 1962, Peterson propone diversos medios sintéticos para el aislamiento de Mixobacteriales en la cual se propone la necesidad del uso de aminoácidos, vitaminas y otros elementos que son esenciales para el crecimiento (Peterson, 1969).

En 1963, Dworkin propone un medio de crecimiento para formas vegetativas de mixobacterias que es enriquecido con diversos aminoácidos y suplementados con vitaminas. La vitamina B-12 estimula el crecimiento de muchas cepas de mixobacterias (McCurdy 1963, 1969).

La capacidad de producir sustancias antibióticas por la célula mixobacteriana es reportada por primera vez por Oxford (Noren *et al.*, 1962) en la década del 60 son detectadas diversas bacteriocinas en especies de *Myxococcus* y *Sorangium* (Ensign & Wolfe, 1965; Brown & Parish, 1976). Se reporta el aislamiento de principios activos que actuarían como sustancias antibióticas (Arias *et al.*, 1979, Gerth *et al.*, 1982), a partir de entonces se ha puesto énfasis en las mixobacterias por considerarse como una nueva fuente de producción de nuevos antibióticos y otros compuestos de uso biomédico (Foster *et al.*, 1992).

Se han reportado aislamientos y posteriores purificaciones de varios elementos extracelulares con diversas actividades tales como: **Antibacterianas**, angiolan A (Kunze *et al.*, 1985); *corallopinironin* A, B y C (Rolf *et al.*, 1985) megovalicinas A,B,C,D,G (Miyashiro *et al.*, 1988); myxovalarginas (Irschik *et al.* 1983); sorangicinas A,B (Irschik *et al.* 1987). **Antifúngicos** como *aurachin* A,B,C y D (Kunze *et al.*, 1987); *cyrmenin* A,B1,B2 (Sassef *et al.*, 2003); condramidas A,B,C,D (Kunze *et al.*, 1995); haliangicinas A,B,C,D (Kundin *et al.*, 2003; melitiazoles, un nuevo beta-methoxyacrilato inhibidor de la cadena respiratoria (Sassef *et al.*, 1999); *nannochelin* A, B,C (Kunze *et al.*, 1992); el *ripostatin*, inhibidor de RNA polimerasa de Eubacteria (Irschik *et al.* 1995); los sorafenos (Gerth *et al.*, 1994). **Antitumorales**: *Argyrin* A,B,C,D,E,F,G,H (Sassef *et al.*, 2002); *epothilons* A y B (Gerth *et al.*, 1996); glidobactinas D, E, F, G (Oka *et al.*, 1988); *stipiamide* (Kim *et al.*, 1991); *tartrolons* A,B (Irschik *et al.*, 1995); tubulysin

(Sassef *et al.*, 2000) entre otros. Además de metabolitos de actividad anticoagulante (Masson *et al.*, 1988); y metabolitos de actividad insecticida (Sehdev & Dhala, 1992).

Se han reportado aislamientos cualitativos y cuantitativos de mixobacterias en suelo de todo el mundo, como por ejemplo en el sur de Inglaterra se consigue aislar un número de 2000 a 75000 bacteriolíticos por gramo de suelo; el número se incrementa dramáticamente en compost donde se obtiene 50000 células de *Myxococcus fulvus* por gr de suelo (Singh, 1947).

En un estudio de varios tipos de suelo en Yugoslavia se encuentra de 1500 a 800000 bacteriolíticos por gramo. Estas abundantes poblaciones se pueden deber a que el suelo de la zona es aluvial con altos contenido de carbonato de calcio (Sabados-Saric, 1957). En el sudeste de Canadá, el número de *Myxococcus-Coralloccoccus*, fue determinado entre 1000 y 45000 por gr (McCurdy, 1969). En cultivos de suelos pantanosos de la península de Kola el aislamiento de mixobacterias celulolíticas presentó un rango arriba de  $10 \times 10^7$  células por gramo de suelo (Zhukova, 1959). Todos estos estimados son posiblemente bajos debido a la selección de especies, por lo que se puede concluir que las myxobacterias se encuentran presentes en suelos en sustanciales cantidades (Holt *et al.*, 1994, Reichenbach, 1999).

Se considera a un organismo cosmopolita, ya que su distribución es global. Su aislamiento se ha conseguido a partir de diversos tipos de suelos como son de climas fríos: Antártico (Ruckert 1985, Dawid *et al.*, 1988), suelos áridos de México (Brockman, 1976) , en aguas (Hook, 1977), aguas de mar (Iizukat *et al.*, 1988) y pantanos (Hook, 1977).

En nuestro medio la literatura producida es escasa, pues hasta el momento sólo se ha realizado una evaluación de metodología de aislamiento para este grupo bacteriano con un número restringido de muestras (Ramírez, 1991).

Para la identificación de los diversos géneros de este grupo bacteriano se propone la caracterización de cuerpos fructificantes, colonias vegetativas, bioquímica primaria (Holt *et al.*, 1994), Aunque se han reportado ciertas técnicas como, comparación de secuencias de ácidos grasos en cromatografía y biología molecular actualmente (Wolfgang, 2000), sin embargo, estos siguen siendo métodos insuficientes y restringidos a unas pocas especies, además de ser complejas y costosas.

### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

- Estudiar Mixobacterias en muestras de suelos en Lima.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Aislar Mixobacterias a partir de muestras de suelo.
- Caracterizar morfológicamente las cepas aisladas.
- Relacionar las especies aisladas con los factores abióticos y bióticos de los lugares de procedencia.
- Comparar las especies de Mixobacterias aisladas en nuestro medio con las obtenidas en suelos de otros países.

## **IV. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.1. MATERIAL DE LABORATORIO**

#### **4.1.1. EQUIPOS**

- Autoclave
- Balanza analítica
- Balanza de platillo marca OHAUS capacidad 500 g
- Baño María con agitador
- Cámara de luz ultra violeta
- Horno
- Cámara fotográfica
- Computadora
- Estereoscopio
- Incubadora Universal
- Mechero de Bunsen
- Microscopio compuesto óptico.
- Microscopio de contraste de fases

#### **4.1.2. MEDIOS DE CULTIVO**

- Agar-Agar x 500 g
- Medio Casitone DIFCO x 200 g
- Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) x 200 g
- Caldo Trypticase soya x 200 g
- Extracto de Levadura x 300 g
- Medio Agar Levadura (A-L)
- Medio Agar Agua (A-A)
- Medio Agar Azúcares (A-S)
- Medio Agar E. coli (MEC)
- Medio Agar PT (A-PT)
- Medio IM-1
- Medio Stanier (A St)



#### **4.1.3. INSUMOS**

- Alcohol – Acetona x 20 mL
- Almidón Soluble x 50 g
- Celulosa Pulverizada x 50 g
- Cloruro de Sodio x 500 g
- Cloruro de Calcio x 50 g
- Cloruro de Hierro
- Cristal Violeta
- Fosfato de Potasio x 50 g
- Fosfato Dipotásico x 50 g
- Galactosa x 10 g
- Levadura seca x 250 g
- Lugol
- Nitrato de Potasio x 30 g
- Rafinosa x 10 g
- Safranina
- Sucrosa x 10 g
- Solución de aminoácidos
- Solución de rojo congo al 0,01%
- Solución de vitaminas
- Sulfato de Magnesio heptahidratado x 100 g
- Vitamina B-12 x 5ml

#### **4.1.4. MATERIAL DE VIDRIO**

- 20 juegos de láminas porta y cubre objetos
- 10 pipetas serológicas de 1 y 5 ml graduados al 1/10
- 200 placas petri de 15 x 100 ml
- 100 tubos de ensayo de 10 x 75 ml
- 300 viales de penicilina
- 2 matraces de 500 ml
- 10 varillas de vidrio
- 1 probeta de 300 ml
- 1 probeta de 1000 ml

#### 4.1.5. OTROS

- Espátulas
- 200 bolsas de polietileno de primer uso 12 x 20 mL
- Algodón, gasa, alcohol, pabilo, papel *kraf*
- *Parafilm*
- marcador
- Rollos fotográficos

## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.1. MUESTREO

#### 4.2.1.1. MUESTRA

Se colectaron muestras de suelos en 6 lugares diferentes de Lima durante los meses de febrero a noviembre de 1994 en las épocas de mayor humedad y precipitación en los lugares naturales, y de mayor irrigación en los lugares controlados por el hombre. Las muestras fueron colectadas en: Bosques de Zárate (20), Jardines de Lima (21), Lomas de Lachay (20), Lunahuaná (20), Valle del Chillón (21) y Pantanos de Villa (12), totalizando 114 muestras a razón de unos 300 gramos de suelo por cada una.

#### 4.2.1.2. ZONAS DE MUESTREO

1. **BOSQUES DE ZÁRATE.** Ubicado a la altura del km 56 de la Carretera Central, en la Provincia de Huarochirí llegando al pueblo de San Bartolomé se demora unas 7 horas a pie para llegar a los Bosques de Zárate (3100 msnm); es un bosque vertical y la vegetación crece en las laderas de los empinados cerros, al llegar al centro de los bosques se aprecia un tupido bosque con abundante flora en la que destaca el cactus San Pedro (*Echinopsis pachanoi*), que tiene propiedades alucinógenas.
2. **JARDINES DE LIMA.** Se consideró la colección de muestras en suelos de jardines, estos se caracterizan por tener terrenos con abono artificial, regadas con agua potable, y con plantas ornamentales. Se

colectó 21 muestras 10 de ellas en jardines del distrito de La Molina, 8 en jardines del distrito del Nuevo San Juan y 3 en jardines del Lima cercado, esta se realizó entre mayo y noviembre.

**3. LUNAHUANÁ.** Es un distrito de la provincia de Cañete, del departamento de Lima. Está ubicado a 38 Km al este de San Vicente de Cañete (Capital de la Provincia de Cañete) y a 182 Km. al Sureste de Lima, en el valle del río Cañete; tiene una campiña fértil en donde se siembran árboles frutales como la vid y el níspero. Se recolectaron 20 muestras de las huertas del lugar iniciando la colección a la altura de la plaza de armas y concluyéndose en el puente colgante de Catapalla, en el mes de agosto ([www.ciudadfutura.com](http://www.ciudadfutura.com)).

**4. LOMAS DE LACHAY.** La reserva nacional de Lachay fue establecida el 21 de junio de 1977 mediante Decreto Supremo N° 310-77AG. Está ubicada en el departamento de Lima, provincia de Huaura, a la altura del kilómetro 105 de la Carretera Panamericana Norte. Se extiende sobre unas 5070 hectáreas.

Las lomas son el resultado de la combinación de factores climáticos propios de la costa condicionado por una geografía peculiar. Lachay se distingue en dos estaciones muy marcadas: la estación húmeda que dura de junio a noviembre que es la más importante; y la estación seca de diciembre a mayo. La primavera se caracteriza porque la vegetación reverdece y atrae a la fauna del lugar, y la segunda se caracteriza por presentar un proceso de desecamiento que termina con la llegada de las primeras nieblas de otoño.

**5. PANTANOS DE VILLA.** Se ubica a 18 km al sur de Lima, es una zona de reserva se estableció el 29 de mayo de 1989 mediante Resolución Ministerial N° 00114-89-AG/DGFF. A partir de 1997 la Convención RAMSAR reconoce esta zona como Humedal de Importancia Internacional para Aves Acuáticas. Los Pantanos de Villa se hallan integradas al sistema hidrológico del Río Rímac, cuyas aguas subterráneas afloran en una depresión natural de humedales compuesto por totorales que constituyen los principales refugios de más de 155 especies de aves, incluyendo 75 especies migratorias provenientes de todo el continente entre las que destacan el

zambullidor grande (*Podiceps major*), la garza blanca (*Egretta tula*). Esta es la única área natural protegida de Lima y contiene 396 hectáreas. La colecta se realizó en febrero.

**6. VALLE DEL CHILLÓN.** Ubicada al norte de la ciudad de Lima, a 20 kilómetros de trayectoria por la carretera Panamericana. Tiene una extensión o área de drenaje de 2,444 Km<sup>2</sup>, de la cual el 42%, o sea 1,039 Km<sup>2</sup>, corresponde a la cuenca húmeda, denominada así por hallarse por encima de la cota de los 2,500 msnm, límite inferior fijado al área que se estima contribuye efectivamente al escurrimiento superficial. Limita por el norte con las cuencas de Chancay-Huaral, por el sur con el valle del Rímac, por el este con el valle del Mantaro y por el oeste con el Océano Pacífico. En términos de demarcación política cubre a la provincia de Canta y al distrito de Carabaylo, que son cortados por el Río Chillón; se siembran hortalizas y otros productos de pan llevar, el terreno es constantemente abonado y regado con las aguas del río que contiene un alto grado de contaminación. Se colectó 21 muestras en las diversas chacras del lugar, buscándose sobre todo la diversificación de sembríos y esta se realizó en el mes de junio.

#### **4.2.1.3 TIPOS DE SUELOS**

La clasificación de los tipos de suelos de las muestras colectadas se hizo tomando en cuenta 2 criterios: primero por las propiedades medibles de la textura de éste y segundo por los factores bióticos y abióticos del lugar de procedencia, tales como vegetación presente, tipo de agua que mantiene al suelo, clima de la zona. Se consideró al agua como factor principal, para la abundancia de myxobacterias. Los suelos se clasificaron en 4 grupos:

**1. SUELOS DE TIPO 1: ARENOSO.** Terreno formado principalmente por arena, tamaño de partícula 0,02 y 2mm, con vegetación herbácea y con algunos árboles, regados con lluvias naturales, son los casos de Lomas de Lachay y Lunahuaná.

**2. SUELOS DE TIPO 2: ARCILLOSO-PEDREGOSO.** Terreno formado principalmente por arcilla, partículas menores a 0,005mm, y piedra con abundante materia orgánica, vegetación arbustiva, regada con lluvia natural, con presencia de ganado caprino y vacuno, es el caso de los bosques de Zárate, y algunos jardines de Lima.

**3. SUELO DE TIPO 3: ARCILLOSO-LIMOSO.** Terreno preparado, de textura lisa pero no tan fina como el suelo arcilloso, mezclado con fertilizantes y materia orgánica de constante renovación, con plantas de tallo corto, se usa aguas servidas para su riego, con alta carga de contaminantes, es el caso de suelo de Valle del Chillón, suelos de Lunahuana y algunos suelos de Jardines de Lima.

**4. SUELO DE TIPO 4: PANTANOSO.** Terreno natural con alto contenido de sal y pobres en oxígeno, con la flora y fauna nativas del lugar y adaptadas al medio. Ejemplo los Pantanos de Villa.

Las muestras se tomaron en 6 lugares, tratando de cubrir las posibilidades que presenta Lima en sus diversos ecosistemas y suelos. Los puntos de muestreo se señalan en la Tabla 1.

TABLA Nº 1. Zonas de muestreo y tipos de suelo.

Nº	ZONA	TIPO DE SUELO	Nº MUESTRAS
1	BOSQUES DE ZÁRATE	Arcilloso-pedregoso	20
2	JARDINES DE LIMA	Arcilloso-pedregoso, Arcilloso-limoso	21
3	LOMAS DE LACHAY	Arenoso	20
4	LUNAHUANÁ	Arenoso, Arcilloso-limoso	20
5	PANTANOS DE VILLA	Pantano	12
6	VALLE DE CHILLÓN	Arcilloso-limoso	21
	<b>TOTAL</b>		<b>114</b>

#### 4.2.2 COLECTA Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

Se colectó un total de 114 muestras de suelo, en 6 zonas diferentes con diferentes tipos de suelo y vegetación, entre otros factores de manera que permita establecer variabilidad (Tabla N° 1).

La cantidad colectada fue de 300 g por muestra. La colección se realizó utilizando espátulas estériles. Éstas, después de su uso, se lavaron con agua destilada y se sumergieron en alcohol para ser flameadas al mechero y nuevamente ser utilizadas. Para la recolección de las muestras se procedió primero a limpiar de hojarasca el área seleccionada, luego el suelo fue colectado en bolsas de polietileno de primer uso, enseguida se procedió a rotular el código y número de la muestra, datos que también fueron copiados en una libreta de mano, en la cual además se adicionaron las características de la zona de colecta de la muestra, como son tipo de vegetación, tipo de suelo, temperatura, pH y otras ocurrencias. Al terminar la colección de varias muestras, se trasladaron al laboratorio para su procesamiento inmediato.

#### 4.2.3 AISLAMIENTO DE *Escherichia coli*

La muestra se tomó de un pozo de almacenamiento de agua para consumo humano, en el asentamiento humano “San Fernando” Distrito de San Juan de Lurigancho, Lima. Ésta fue colectada en un frasco de vidrio estéril de 500 mL a la cual se le había añadido 0,5 mL de tiosulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) al 3% como agente reductor, siguiendo las normas especificadas en los *Standard Methods for the Examination for water and Wastewater*. Luego la muestra se trasladó al laboratorio a 4 °C para su inmediato análisis.

El análisis microbiológico de la muestra se realizó por el método de filtración de membrana para la numeración de coliformes fecales en el medio M-FC (DIFCO). Se filtró 100 mL de la muestra de agua a través de una membrana de nitrocelulosa de 0,45µm de diámetro de poro, mediante el uso de un sistema de filtración estéril y una bomba de vacío. La membrana filtrante resultante se sembró en una placa con el medio M-FC y la placa fue incubada y sumergida en baño maría a 44, 5 °C por 24 h. Las colonias de coliformes fecales en este medio son azules, las de no fecales son de tonos grisáceos. Se seleccionó las colonias azules para su posterior identificación bioquímica.

La identificación bioquímica de las cepas se realizó, en función a las pruebas recomendadas para la diferenciación de bacterias coliformes: comportamiento en TSI, Indol, Rojo metilo, Voges Proskauer, citrato de sodio, motilidad, urea y lisina descarboxilasa.

Las características de la cepa de *Escherichia coli* utilizada en los cultivos de myxobacterias como MEC y Singh Modificado fueron las siguientes:

• TSI:	A/A
H <sub>2</sub> S	(-)
GAS	(+)
• Indol	(+)
• Rojo metilo	(+)
• Voges Proskauer	(-)
• Citrato de sodio	(-)
• Motilidad	(-)
• Urea	(-)
• Lisina descarboxilasa	(+)

La cepa de *Escherichia coli* obtenida fue guardada en cepario a -4 °C para su posterior utilización.

#### **4.2.4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SUELO**

Las bolsas con las muestras de suelo fueron abiertas en un ambiente aséptico, luego se retiró unos 50 g de tierra de ellas y se trasladaron a un recipiente estéril, se añadió agua destilada, también estéril para seguidamente ser batida con una espátula hasta conseguir una consistencia de lodo por muestra, luego de conseguido ésta es sembrada en pequeñas porciones del tamaño de un guisante sobre los medios básicos de aislamiento primario.

#### **4.2.5 AISLAMIENTO PRIMARIO DE MIXOBACTERIAS**

Cada muestra procesada y después sembrada en los medios de aislamiento primario: Medio K&K, Medio Singh y medio Stanier modificado, fue revisada con el estereoscopio a los pocos días de cultivada y los cuerpos fructificantes

encontrados fueron aislados en medios de cultivo para su purificación. Por lo general es necesario que transcurra entre 3 a 5 días como mínimo para empezar a revisar las muestras, debido que las myxobacterias tienen un crecimiento lento y que en muchos casos no permite la formación de una colonia completamente visible. En esta etapa utilizamos la nistatina como sustancia inhibidora de hongos que se presentan como principales competidores de nuestro grupo de interés, aun cuando se sabe que el suelo es un ambiente donde existen múltiples organismos como bacterias, amebas, mohos, levaduras, larvas de insectos entre otros que dificultan muchas veces la visualización y aislamiento del grupo en estudio.

A cada una de las cepas seleccionadas durante este aislamiento primario se les nominó con la primera letra del lugar de procedencia de la muestra tal es así que para Los Bosques de Zárate (Z), Jardines de Lima (J), Lomas de Lachay (L), Lunahuná (LH), Pantanos de Villa (P) y Valle del Chillón (V). Luego de ello se le colocó un número que representa el orden de las muestras sembradas y finalmente se uso letra del alfabeto en mayúsculas para designar el orden de las cepas diferentes encontradas dentro de una misma muestra a lo largo del periodo de aislamiento de este grupo bacteriano. Por ejemplo una cepa codificada como Z8B significa que la procedencia de ese suelo fue de los Bosques de Zárate, de la muestra número 8 colectada y la letra B corresponde a que fue la segunda cepa diferente en aislarse de esa muestra de suelo así como la cepa codificada como V10D corresponde a suelo colectado en el Valle del Chillón, muestra 10 de suelo y cuarta cepa aislada de ese suelo.

#### **4.2.5.1 AISLAMIENTO DE CEPAS PROTEOLÍTICAS**

##### **A. Medio Krzeminieska and Krzeminieska (K&K)**

Para sembrar el medio K&K (Anexo A) se procede a llenar la placa de Petri con la muestra de suelo en forma de lodo, hasta un tercio de ésta, luego es emparejada con una espátula estéril, para después colocar de 4 a 6 pellets de excremento de conejo. Los *pellets* son previamente autoclavados a 121°C por 15 minutos y después remojados por unas 24 horas en una solución de nistatina (25 mg/mL), esto para evitar la proliferación de mohos y levaduras que son los principales competidores del grupo bacteriano en estudio. Luego las placas sembradas son llevadas a la incubadora a 28°C por un periodo de tiempo de 3 a 21 días.



La revisión es diaria a partir del tercer día; y si hubiera muestras positivas se aíslan inmediatamente al medio de purificación respectivo, y se sigue revisando las muestras, debido a que pueden haber muestras de suelo con más de un tipo de mixobacteria, los cuales pueden aparecer posteriormente.

#### **B. Medio Singh (MSg)**

Se procedió a preparar Agar Singh (Anexo A); éste contiene sales inorgánicas como el cloruro de calcio, que le brinda un medio mínimo de sales, que obliga a las cepas presentes a migrar hacia la capa bacteriana de *E. coli*, que contiene el medio. Este medio contiene el agar agua (Anexo A), el cual se vierte en placas de Petri en una cantidad de 15 mL solidificado, se procede a untar unos 3 ó 4 círculos de *Escherichia coli* concentrada (de 48 a 72 h de incubación a 37 °C y autoclavadas a 121 °C por 15 minutos). Sobre las masas de *E.coli* en forma de círculo ya untadas en el medio se procede a colocar igual número de muestra de suelo húmedo (lodo), del tamaño de un guisante el suelo fue mojado con agua estéril y una solución de nistatina (25 mg/mL). Luego se rotula, envuelven las placas y se guardan a 28 °C examinándose a partir del cuarto día hasta las 2 semanas siguientes. De ser positiva la muestra, se observará la presencia de los cuerpos fructificantes alrededor de las masas de *E.coli* untadas en la placa.

La muestra de *Escherichia coli* fue obtenida de agua contaminada ya anteriormente descrita. Este medio es utilizado como un método complementario para el aislamiento de mixobacteria a partir muestras de suelo que resultaron negativas mediante el uso del medio K&K, se realizó 2 siembras sucesivas.

#### **4.2.5.2 AISLAMIENTO DE CEPAS CELULOLITICAS**

##### **A. Medio Stanier modificado (MSt)**

El medio Stanier (Anexo A) está compuesto por un conjunto de sales que sirven como medio mínimo y buffer, este medio al ser pobre obliga a las mixobacterias a buscar en el papel filtro su fuente de energía. El papel filtro previamente es autoclavado a 121 °C por 15 minutos. Se coloca cuidadosamente sobre el Agar Stanier que le servirá de soporte,

proporcionará humedad y un medio mínimo, obligando a las cepas de myxobacterias celulolíticas a utilizar el papel filtro como fuente de alimento. Seguidamente se procedió a colocar de 3 a 4 porciones de lodo sobre el papel filtro. A este medio, al igual que a los anteriores, se le adiciona Nistatina (25 mg/mL) a la masa de lodo como elemento preventivo para evitar o atenuar el crecimiento sobre todo de hongos y amebas que se encuentran en suelos. Luego de finalizar la siembra las placas son envueltas y guardadas en un lugar seguro a 28 °C por 1 a 4 semanas, tiempo en el cual se irá revisando diariamente.

#### **4.2.6. PURIFICACIÓN DE CEPAS**

Una vez que se comprobó la presencia y de cuerpos fructificantes sobre las muestras de suelo cultivadas en los medios de aislamiento primarios (K&K, Msg, Mst), se procedió rápidamente a su purificación mediante el uso de medios más selectivos con sustancias que inhiban el crecimiento de sus competidores, tales como los hongos. Para ello se realizó sembrados sucesivos de los cuerpos fructificantes aislados y codificados hasta completar su purificación. Se debe mencionar que se agregó Actidione (ciclohexamida) a los medios para aumentar su selectividad y controlar el crecimiento de mohos y levaduras.

Es así que los cuerpos fructificantes presentes en las placas de aislamiento fueron sembrados en los medios: Agar Pellets, Medio Singh para el caso de especies de nutrición proteolítica y Agar Stanier Almidón para especies de naturaleza nutricional celulolítica. Ni bien eran detectados las mixobacterias se cogía, con el uso de una asa de siembra, los cuerpos fructificantes más limpios a simple vista, y se sembraba en el respectivo medio de purificación; la placa Petri se incubaba a 28° C. Estas siembras eran revisadas a partir de las 24 h de crecimiento y se procedía a trasplantar los nuevos cuerpos fructificantes en sucesivos siembras de purificación en estos mismos medios, hasta que mediante la comprobación de pureza se confirmaba su total purificación para ser guardado y usado en las pruebas de la fase vegetativa.

Para la purificación de especies bacteriolíticas como ya se mencionó se emplearon los siguientes medios:

- Agar pellets (AP).

- Medio Singh (MSg)

Para la purificación de especies celulolíticas se empleó el medio:

- Agar Stanier almidón (ASTA)

**A. Medio Agar Pellets (AP).** Consiste en colocar sobre una placa de Petri unos 10 mL de agar agua (AA), como fuente base ya que contiene cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) como sal inorgánica. A este medio mínimo de soporte después de preparado y autoclavado se le añade ciclohexamida (concentración de 25 mg/L); sustancia que sirve como controlador para evitar la contaminación y proliferación de mohos y levaduras que pudieran traer las cepas de mixobacterias aisladas. Luego se vierte el medio en placas de Petri con la mayor asepsia y antes que éste se solidifique; se incrusta sobre el medio de 4 a 6 *pellets* (estéril) de conejo, previamente autoclavados a 121 °C x 15 minutos y luego remojados 24 h en ciclohexamida a una concentración de 25 mg/mL. Se cubre la placa para que se solidifique. Los *pellets* de conejo quedan incrustados hasta la mitad sobre el agar agua. Las mixobacterias transplantadas en su fase quística se transformarán y crecerán en su fase vegetativa sobre los *pellets* aprovechando como alimento la abundancia de carga bacteriana que se encuentra en este sustrato. Con el tiempo, luego de agotarse su fuente de alimento, las mixobacterias se agregan para formar nuevamente una fase quística, formando cuerpos fructificantes que se puede evidenciar a simple vista o con un estereoscopio.

**B. Medio Singh** .- Se emplea en su preparación el medio Agar agua (AA), es un medio carente de nutrientes, ya que sólo tiene al cloruro de calcio dihidratado como una fuente mineral. Una vez vertido y solidificado en la placa Petri el medio AA, se unta sobre la superficie de ésta unas asadas en círculo de *Escherichia coli* concentrado (de 48 a 72 h. de incubación en Caldo Luria), como sustrato nutritivo para las mixobacterias. La masa microbiana se distribuye densamente en forma de círculos en número de 3 a 4 por placa. En el centro de cada círculo bacteriano se siembran directamente los cuerpos fructificantes procedentes del aislamiento primario. Se guarda a 28 °C y se empieza a revisar a partir de las 48 horas. Se revisa y si se comprueba el crecimiento sobre este medio, se somete a una prueba de pureza mediante el sembrado del nuevo cuerpo fructificante sobre caldo BHI a 37 °C por 24 h (Anexo A). La limpieza del medio certificará la pureza

de la cepa ya que ésta no metaboliza los sustratos orgánicos de este medio, además de que la temperatura utilizada no la favorece por el contrario la flora asociada a la mixobacteria si lo hace por lo cual en caso de impureza el caldo BHI se visualizará turbio. Sucedido este último se procede a seguir transplantando los cuerpos fructificantes y realizar las pruebas de pureza respectiva en los pasos que sean necesarios para su definitiva purificación.

**C. Agar Stanier Almidón (ASA).** El Medio Stanier (Anexo A), se compone de las sales minerales como nitratos, fosfatos, sulfatos entre otros como medio mínimo que le proporcionará sales y humedad al medio, además de almidón soluble como fuente de energía. Este último reemplaza al papel filtro en el anterior medio Stanier modificado utilizado en la etapa de aislamiento primario.

Para facilitar la purificación de las cepas de mixobacterias, se añadió cicloheximide (25 µg/mL), como sustancia que evita la proliferación de mohos y levaduras que generalmente se convierte en los más asiduos competidores de las myxobacterias, por tener ciclos de vida más cortos, no así las bacterias que en muchos casos les sirven de alimento. Las placas se incuban a 28 °C y se revisan a partir del cuarto día, en este medio crecerán las mixobacterias de naturaleza celulolítica.

Una vez purificadas las mixobacterias en su fase quística se procede a realizar una prueba para corroborar dicha purificación, ésta es llamada **prueba de pureza**.

Para ello se toma con una asa de siembra estéril en un ambiente aséptico unos cuerpos fructificantes, los cuales se siembran en Caldo Cerebro Corazón (BHI), los tubos son incubados a 37 °C x 24 h en agitación. Estos son revisados al día siguiente, comprobándose su pureza, para lo cual el medio debe permanece claro y limpio sin sedimento alguno, en caso de estar contaminado, el medio se visualizará turbio. En este caso se procederá a tratar de identificar a los contaminantes y seguir purificando la cepa de mixobacteria con sucesivos pasos de purificación en los medios ya descritos y considerando la adición de antibióticos y/o antimicóticos para su ayuda.

#### 4.2.7. OBTENCIÓN DE FORMAS VEGETATIVAS DE MIXOBACTERIAS

Comprobada la pureza de la cepa, se procederá a sembrar en medios muy enriquecidos, teniendo en cuenta la naturaleza nutricional, de la cepa purificada. Las cepas bacteriolíticas serán cultivadas en agar y caldo CT, Medio IM-1 y Agar levadura.

La siembra en estos medios fue realizada para evidenciar la fase vegetativa que requiere de estos medios muy enriquecidos. La obtención de esta fase de crecimiento nos servirá para determinar las características culturales que exhiben sólo durante esta fase las cepas mixobacterianas, siendo éstas en algunos casos de vital importancia para completar su identificación.

Como lo mencionamos las características obtenidas desde el inicio de los cultivos primarios y de purificación, en la observación de la fase de cuerpos fructificantes son de vital importancia y en muchos casos nos dan el diagnóstico final; pero ante cualquier duda será necesario recurrir a la observación de las características obtenidas en la fase vegetativa con lo que se tendrá una visión más completa para la determinación taxonómica de los géneros y especies correspondientes.

**A. Medio CT.** Contiene casitone (DIFCO), como un nutriente altamente nutritivo pues contiene aminoácidos, además de contener sulfato de magnesio heptahidratado como sal inorgánica, estos elementos son mezclados con el Agar Agar a un buffer fosfato de potasio al 0.01M (ver Anexo A) y autoclavados a 121 °C por 15 minutos para su esterilización.

**B. Medio Agar Levadura (AL).** contiene como fuente altamente nutritiva a la levadura seca que es usada en panadería. Se utilizó la marca Fleishman, la cual a un 0,5% se revitalizó por 30 minutos en agua temperada y se procedió a mezclar con el Agar y la cianocobalamina al 0,5 ug/ml a un pH de 7.2. La vitamina B12 o cianocobalamina es importante como factor de crecimiento para algunas cepas de mixobacterias (McCurdy, 1963). El cuerpo fructificante es sembrado en el centro de la placa e incubado a 28 °C por 2 a 4 días, se realizan observaciones periódicas en ese tiempo. A simple vista se observará en la placa, el movimiento deslizante en forma de enjambres alrededor del punto de siembra. Este tipo de movimiento lo realizan en fase vegetativas. Las

mixobacteriales, que al consumir a las levaduras presentes en el lugar como alimento se multiplican y se desplazan en busca de más de ellas, logrando así describir un desplazamiento, que es útil también para la clasificación. Las masas bacterianas obtenidas en este medio se utilizan también para realizar la prueba de coloración Gram para observar las características de las formas unicelulares de este grupo ya que sabemos que son Gram negativos. Este detalle también ayuda en la clasificación.

**C. Medio IM-1.** Es un medio muy enriquecido para la purificación de cepas celulolíticas; como componentes tiene un conjunto de sales como el nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ ), una fuente de nitrógeno, fosfato hidratado dipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) que actúa como un buffer, para mantener en condiciones neutras el pH; el sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), cloruro de hierro ( $\text{FeCl}$ ), Casitone (DIFCO) como fuente de aminoácidos, y Celobiosa como fuente de carbono y elemento de uso por las cepas de naturaleza nutricional celulíticas. A este medio al igual que los anteriores y en las mismas concentraciones también se le adiciona Actidione (ciclohexamida), como inhibidor de contaminantes, sobre todo mohos y levaduras. El pH del medio es de 7.2 – 7.4.

#### **4.2.8. IDENTIFICACIÓN DE CEPAS**

Desde la etapa inicial de aislamiento, al obtener los primeros cuerpos fructificantes, se empezó a registrar las características de las cepas obtenidas lo que sirvió para su identificación posterior. Las características a tomar en cuenta fueron: la procedencia de la muestra, forma, tamaño, color de los cuerpos fructificantes, también se observa las características de las mixosporas, tales como tamaño y forma. El color en esta fase no fue determinante ya que muchas cepas modifican esta característica de acuerdo al tipo de luz y del medio en el que se desarrollan. También en la fase vegetativa se evaluó el crecimiento de las cepas en los diversos medios de cultivo ya sean líquidos o sólidos, además de proceder a evaluarlas mediante las pruebas bioquímicas respectivas. Por último, para completar la identificación taxonómica, se observó la morfología celular al microscopio óptico.

#### 4.2.8.1 CUERPOS FRUCTIFICANTES

**A. FORMA:** La forma de los cuerpos fructificantes se convierte en la guía principal para un acertado diagnóstico, pues se pudo observar cuerpos fructificantes simples o compuestos, además de la presencia de estructuras y accesorios como pedúnculos o pies. También se observa la presencia o no de microquistes, que no son sino mixosporas con cubierta, así como la forma que adoptan los diversos esporangiolos, de sencillos o múltiples. Se utiliza el estereoscopio en esta etapa.

**B. COLOR.-** Es una característica de cierta importancia para la identificación sobre todo hay que aprovechar observar ésta durante los primeros días de detectado el crecimiento de los cuerpos fructificantes, pues conforme pasa el tiempo y se expone a la luz se pierden las características iniciales de tono, intensidad y hasta puede haber un cambio de color. Los cuerpos fructificantes pueden ser observados a simple vista o con un estereoscopio.

**C. TAMAÑO:** El tamaño de los cuerpos fructificantes y la de sus estructuras, como esporangiolos, microquistes y mixosporas es de importancia para la diferenciación en varios géneros, para ello se utilizó una lámina micrométrica para la toma de la medida al microscopio de 10x. El tamaño es un dato que contribuye en la determinación taxonómica junto a otros parámetros pues solo no representa mucho.

**D. CONSISTENCIA:** Es una característica también importante dentro de la cual se pueden diferenciar en blandas o duras, y además simultáneamente superficialmente pueden ser viscosas, rugosas, lisas etc. Es importante que se determine la consistencia de los cuerpos fructificantes cuando estén jóvenes, pues a más días de su aparición en los medios de cultivo se van desecando por efecto de los factores externos como calor, humedad etc.,.

#### 4.2.8.2. MIXOSPORAS – MICROQUISTES

Debemos considerar que no todas las mixobacterias desarrollan microquistes, pues observando este detalle podemos ir diferenciando

también a la especie presente. El grupo que no presenta la envoltura particular que le confiere mayor protección tan sólo presenta la mixospora desnuda, en ambos casos, se observarán las diversas características, como si son esféricas, ovales, abastionadas; el tamaño, además si son refráctiles u oscuras y si aceptan el rojo congo o no. Las observaciones se realizan con lámina micrométrica al microscopio ocular 10x.

#### **4.2.8.3. FASE VEGETATIVA**

Una vez obtenido el crecimiento de mixobacterias en medios especiales para esta fase vegetativa, se procedió a la observación microscópica, mediante el uso de la técnica Gram, para diferenciar en primera cuenta la forma de las células así como si los extremos son romos o en punta; el desplazamiento de las colonias sobre los cultivos en placa también tiene importancia pues pueden describir algunas formas de enjambre como radial, ondulado. También se considera el comportamiento en medios líquidos. Las cepas en esta fase se someten a pruebas bioquímicas cuando fuera el caso necesario, tales como catalasa, oxidasa y otras que se señalarán más adelante.

#### **4.2.8.4. CLAVE DE IDENTIFICACIÓN**

La clasificación de este grupo bacteriano, se realiza casi enteramente por caracteres morfológicos, en parte por razones históricos y porque la información fisiológica está restringida a unas pocas cepas de mixobacterias. La reacción del Rojo Congo en la viscosidad de la cepa (McCurdy, 1969) ayuda inicialmente en la definición del camino a seguir.

Existen muy pocas especies atípicas y puede haber con este grupo ciertos problemas para su clasificación final por el método morfológico, solucionándose al emplear ciertos ensayos como la secuenciación de ADN.

A continuación se presenta una clave que ayudará a identificar a las Mixobacterias mediante su comportamiento cultural (Holt *et al.*, 1994).



**GRUPO 1.** Las células vegetativas son largas y flexibles, con bacilos terminado en puntas, la mixosporas son diferentes entre los especies del grupo, forma varillas cortas, esféricas o alargadas; las colonias se observan en forma de enjambres con patrones radiados sobre las placas, en su mayoría no erosionan el agar en su fase vegetativa. Los cuerpos fructificantes con o sin esporangiolos, simples o compuestos, retienen el rojo congo al 0.01% en su fase vegetativa.

A. Mixosporas son esféricas u ovoides, las células vegetativas son largas (3-8  $\mu\text{m}$ ) las colonias en el agar no forman estructuras en el centro, pero en los bordes de las placas describen una forma ondulada radial, enjambres con alta viscosidad, los cuerpos fructificantes son simples sin esporangiolos a excepción del género *Angiococcus*

1. Cuerpos fructificante son simples, sin esporangiolos

a. Los cuerpos fructificantes son blandos, mocosos, viscosos. En su fase vegetativa muchas especies erosionan el agar. frecuentemente con constricciones que se levanta de su base como un pequeño tallo.

Género *Myxococcus*

b. Los cuerpos fructificantes son duros, viscosos de consistencia cartilaginosa, pústulas rígidas frecuentemente con protuberancias en forma de dedos o de forma de corales

Género *Corallococcus*

2. Los cuerpos fructificantes son compuestos, pequeños esporangiolos algo esféricos marrón naranja a rojo marrón

Género *Angiococcus*

B. Mixosporas son pequeñas, barras gordas, algunas veces algo esféricas, pero por lo general irregulares. Las células vegetativas son varillas largas (5-12 $\mu\text{m}$ ) con terminaciones agudas, algunas veces en forma de bote, colonias de enjambre son estructuras conspicuas, son largas y curvadas en cadenas radiales, los cuerpos fructificantes mayoritariamente con esporangiolos que pueden ser simples con un tallo individual o compuestos.

1. Los Cuerpos fructificantes son simples, sin esporangiolos, de formas variables ; durante la fase vegetativa sobre el agar forman en el extremo bordes ondulados con consistencia abultada y dura. Las mixosporas son barras cortas, gordas; las células vegetativas son largas, delgadas, y aguja-formado.

Género: *Archangium*

2. Los cuerpos fructíferos consisten en esporangiolos.

a. Las células vegetativas son largas delgadas, en forma de aguja.

a.1. Los cuerpos fructíferos son racimos de los esporangiolos, que parecen una cápsula visible, común compuesta de limo (matriz), sentando directamente sobre el substrato.

Género: *Cystobacter*

a.2. Los cuerpos fructificantes son los esporangiolos solos, minúsculos, cada uno en un tallo delicado.

Género: *Mellitangium*

b. Las células vegetativa son moderadamente largas (5-8  $\mu\text{m}$ ), en forma de barco; los cuerpos fructíferos consisten en un tallo que lleva uno o varios esporangiolos.

Género *Stigmatella*

**GRUPO 2.** Las células vegetativas de ancho uniforme (bacilos o cocos), con el extremo redondeado, las mixosporas son generalmente muy similares de forma y tamaño ópticamente son refráctiles (excepción: *Nannocystis* con las mixosporas esféricas); las colonias del enjambre son a menudo sub superficiales, por lo menos en parte de tal manera que sobre el agar las venas pueden o no estar presentes (de vez en cuando muy pronunciado), borde a menudo con amplios lóbulos o sectores en forma de abanico; cuerpos fructíferos siempre con los esporangiolos y casi siempre compuestos (excepciones: *Nannocystis*, *Haplangium*), limo no se mancha con la solución del rojo de Congo; ningunos ácidos grasos 2-hidroxy; G + C 70-72 el mol%

**A.** Mixosporas en forma de barras cilíndricas, ópticamente más o menos refráctiles. Los cuerpos fructificantes consisten en esporangiolos y son casi siempre compuestos.

1. Cuerpos fructificantes son esporangiolos simples

a. El cuerpo fructificante es un esporangio grande (los 60-200µm), globular, sésil, a menudo con una superficie arrugada, encontrada en la corteza y la madera en descomposición.

Género: *Haploangium*

b. Los cuerpos fructificantes son pequeños (6-40 µm), con esporangiolos ovoides a esféricos dentro del sustrato, solitario, dispersado, o arracimado a veces ambos; las mixosporas son esféricas y ópticamente refráctiles. pueden ser individuales, dispersos reunidos en grupo y paquetes; las colonias en placas de agar son típicas del enjambre pero corroen el sustrato. Las células vegetativas son cilíndricas cortas casi en forma de cubos

Género: *Nannocystis*

2. Los cuerpos fructificantes consisten en grupos de esporangiolos que se encuentran directamente o dentro del sustrato.

a. Los esporangiolos de muchas especies son muy largos (60-400 µm); otras, son de tamaño moderado, hay veces integrados en un envoltura común llamado limo, de tipo nutritivo bacteriolítico.

Género: *Polyangium*

b. Esporangiolos usualmente algo pequeños (20-30 µm), producido en enormes números; descomponen la celulosa.

Género: *Sorangium*

c. Los cuerpos fructíferos son racimos de los esporangiolos color naranja , ramificados o no, tallos de barro blanco, muy grandes (300-600 µm) e impresionan

Género: *Chondromyces*

#### **4.2.9 OTRAS PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN UTILIZADAS**

Cuando las características fenotípicas de los cuerpos fructificantes, mixosporas y células bacterianas así como las características de las colonias no son suficientes para la identificación, se recurre al uso de algunas pruebas bioquímicas; sobre todo para diferenciar especies del mismo género. Las siguientes son algunas pruebas a las cuales se somete a la mixobacteria en fase vegetativa: Almidón, Caseína, Catalasa, Esculina, Gelatina, Inulina, Nitrato, Oxidasa, Sucrosa, Tween 80 y Urea.

#### **4.2.10. MANTENIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE CEPAS**

Se procedió a autoclavar la muestra de suelo colectada teniendo en cuenta de que sea del origen de la obtención de la respectiva cepa a mantener. Se autoclava para eliminar contaminantes.

Simultáneamente se obtiene una cierta cantidad de masa de *E. coli* la cual se obtuvo sembrando la respectiva cepa en caldo BHI, a 37° C en agitación por 24 h, centrifugada a 1000 rpm, lavada en agua bidestilada las veces que sean necesarias para obtener una pasta blanquecina, luego autoclavada y secada al horno a 37 °C x 3 h o hasta lograr su deshidratación total. Finalmente la masa de *E. coli* es adicionada a la muestra de suelo, se agita el vial para homogenizar la mezcla.

Se le añade luego la cepa de mixobacteria que se va a conservar la cual ante la presencia del alimento se multiplica en su fase vegetativa hasta agotar los nutrientes y entrar en una etapa de cuerpos fructificantes y luego en letargo hasta que encuentre nuevas condiciones favorables.

Se selló herméticamente el vial con parafina líquida, se rotularon los datos y se guardaron a 4 °C. Mediante este método se puede mantener hasta 4 años la cepa, aunque se aconseja revisar con aislamientos periódicos cada año en medio Agar Pellets.

## V. RESULTADOS

### 5.1. AISLAMIENTO PRIMARIO

Las 114 muestras de suelo se sometieron a 3 medios de aislamiento: K&K, Singh y Stanier. Como se sabe que nutricionalmente existen 2 grupos definidos de Mixobacterias; para el aislamiento de cepas **bacteriolíticas** se procedió a sembrar por duplicado todas la muestras en el medio K&K. Luego de evaluadas se procedió a sembrar las muestras que dieron negativo en el medio Singh.

Para el aislamiento de cepas de naturaleza nutricional celulolítica se procedió a sembrar la muestra de suelo en el medio Stanier repitiendo una vez más cuando la muestra resultó negativa (Tabla 2).

A partir del aislamiento primario, fueron transplantadas cuidadosamente a sus respectivos medios de purificación considerando los grupos nutricionales. En la Tabla 2 se detalla la cantidad de muestras de suelos sembradas con las cepas aisladas en relación a las zonas de procedencia. Se aislaron un total de 165 cepas de las cuales, 156 fueron cepas de naturaleza bacteriolítica aisladas en los medios K&K (136) y Singh (20), y 9 cepas de naturaleza celulolítica aisladas en el medio Stanier (ver detalles del aislamiento en las Tablas 3-7), las cuales se le asigna a cada cepa un código de muestra seguida de una letra en mayúscula que corresponde a la cepa aislada ejemplo la cepa Z1A, la letra Z corresponde a la inicial del lugar de procedencia que en este caso es los Bosques de Zárate; el 1, es el orden de la muestra de esa zona y la letra A, la cepa que se aisló en esa muestra de suelo; para el caso de la muestra 10 de Lunahuaná se logro aislar 6 cepas diferentes siendo la última el L10F.

Se debe acotar que las 12 muestras de Los Pantanos de Villa dieron negativo para todos los casos (Tabla 2).

TABLA Nº 2. Cepas de mixobacterias obtenidas en medios de aislamiento primario mediante los respectivos medios de aislamiento en suelos de Lima.

ZONA	TOTAL		K&K		SINGH		STANIER	
	M Nº	A Nº	M Nº	A Nº	M Nº	A Nº	M Nº	A Nº
BOSQUES DE ZARATE	20	27	20	21	8	5	20	1
JARDINES DE LIMA	21	32	21	25	6	6	21	1
LOMAS DE LACHAY	20	27	20	23	8	3	20	1
LUNAHUANA	20	26	20	23	5	3	20	0
PANTANOS DE VILLA	12	0	12	0	12	0	12	0
VALLE DEL CHILLON	21	53	21	44	1	3	21	6
TOTAL	114	165	114	136	40	20	114	9

M, muestras; A, cepas aisladas

TABLA Nº 3. Cepas de mixobacterias obtenidas en medios de aislamiento selectivos, en suelos del Bosque de Zárate.

MUESTRA	MEDIOS DE AISLAMIENTO		
	K&K	SINGH	STANIER
Z1	A,B	-	-
Z2	-	A	-
Z3	A,B	-	-
Z4	-	-	-
Z5	-	-	-
Z6	A,B	-	-
Z7	A,B	-	-
Z8	-	A,B	-
Z9	A,B	-	-
Z10	A	-	-
Z11	-	A	-
Z12	A,B	-	-
Z13	A	-	-
Z14	A,B,C	-	-
Z15	A	-	-
Z16	A	-	-
Z17	A,B	-	-
Z18	-	-	-
Z19	-	-	A
Z20	-	A	-
TOTAL CEPAS	21	5	1

A,B,C, cepas aisladas por muestra.

TABLA N° 4. Cepas de mixobacterias obtenidas en medios de aislamiento selectivos en suelos de los Jardines de Lima

MUESTRA	MEDIOS DE AISLAMIENTOS		
	K&K	SINGH	STANIER
J1	A	-	-
J2	A,B	-	-
J3	A,B	-	-
J4	A	-	-
J5	-	A	-
J6	A	-	-
J7	-	-	A
J8	-	A,B	-
J9	A,B	-	-
J10	-	-	-
J11	A	-	-
J12	A,B,C	-	-
J13	A,B	-	-
J14	A,B,C	-	-
J15	-	A,B	-
J16	A,B,C	-	-
J17	A	-	-
J18	A	-	-
J19	A	-	-
J20	-	A	-
J21	A	-	-
TOTAL CEPAS	25	6	1

A,B,C, cepas aisladas por muestra.

TABLA Nº 5. Cepas de mixobacterias obtenidas en medios de aislamiento selectivos en suelos de Lomas de Lachay.

MUESTRA	MEDIOS DE AISLAMIENTOS		
	K&K	SINGH	STANIER
L1	-	-	-
L2	-	A	-
L3	-	-	-
L4	A	-	-
L5	A,B	-	C
L6	A,B	-	-
L7	-	-	-
L8	-	A	-
L9	A	-	-
L10	A,B,C,D,E,F	-	-
L11	A	-	-
L12	A,B	-	-
L13	A,B	-	-
L14	-	-	-
L15	-	-	-
L16	A	-	-
L17	A	-	-
L18	-	A	-
L19	A,B	-	-
L20	A,B	-	-
TOTAL CEPAS	23	3	1

A,B,C,D,E,F, cepas aisladas por muestra.



TABLA Nº 6. Cepas de mixobacterias obtenidas en medios de aislamiento selectivos en suelos de Lunahuana.

MUESTRA	MEDIOS DE AISLAMIENTOS		
	K&K	SINGH	STANIER
LH1	-	A	-
LH2	A	-	-
LH3	A,B	-	-
LH4	A	-	-
LH5	A,B	-	-
LH6	-	-	-
LH7	A,B	-	-
LH8	A,B,C	-	-
LH9	A,B	-	-
LH10	A	-	-
LH11	A	-	-
LH12	A	-	-
LH13	A,B	-	-
LH14	A	-	-
LH15	-	A,B	-
LH16	-	-	-
LH17	A	-	-
LH18	A	-	-
LH19	-	-	-
LH20	A,B	-	-
TOTAL CEPAS	23	3	0

A,B,C, cepas aisladas por muestra.

TABLA Nº 7. Cepas de mixobacterias obtenidas en medios de aislamiento selectivos en suelos del Valle del Chillón.

MUESTRA	MEDIOS DE AISLAMIENTOS		
	K&K	SINGH	STANIER
V1	A,B	-	-
V2	A,B,C	-	-
V3	-	A,B,C	-
V4	A	-	-
V5	A	-	-
V6	A,B	-	-
V7	A,B	-	-
V8	A,B	-	-
V9	A,B	-	C
V10	A,B,C	-	D
V11	A	-	B
V12	A,B,C	-	-
V13	A,B,C	-	D
V14	A,B,C	-	-
V15	A,B	-	-
V16	A,B,C	-	D
V17	A,B	-	-
V18	A,B	-	-
V19	A,B	-	-
V20	A	-	B
V21	A,B,C,D	-	-
TOTAL CEPAS	44	3	6

A,B,C,D tipo de cepas aisladas por muestra.

## 5.2 PURIFICACIÓN DE CEPAS

Se obtuvieron 165 cepas en el aislamiento primario de las cuales 136 fueron aisladas por el medio K&K, 20 por el medio Singh y 9 por el medio Stanier. Las cepas procedentes de los medios K&K y Singh fueron sembradas en los medios Agar pellets y Singh en forma simultánea las veces que fueron necesarias hasta su purificación. Las cepas procedentes del medio Agar Stanier fueron transplantadas al Medio Stanier Modificado, para su respectiva purificación (Tabla 8).

A continuación se detalla las veces que fueron sembradas y los medios utilizados para la purificación de las cepas, se debe indicar que algunas cepas se perdían en algunas purificaciones por lo que fue necesario transplantar nuevamente la cepa para su purificación y en algunos pocos casos se trató de aislar nuevamente (Tablas 9-13).

TABLA N° 8. Cepas de Mixococcales obtenidas en medios de purificación en suelos de Lima.

ZONAS DE MUESTREO	TOTAL CEPAS AISLADAS	N° CEPAS PURIFICADAS			TOTAL CEPAS PURIFICADAS
		AGAR PELLETS	AGAR SINGH	STANIER MODIFICA	
BOSQUE DE ZARATE	27	16	6	0	22
JARDINES DE LIMA	32	17	10	1	28
LOMAS DE LACHAY	27	11	9	1	21
LUNAHUANA	26	21	2	0	23
PANTANOS DE VILLA	0	0	0	0	0
VALLE DEL CHILLON	53	37	4	2	43
TOTAL	165	102	31	4	137

TABLA N° 9. Purificación de cepas provenientes de medios de aislamientos de muestras del Bosque de Zárte.

N°	MUESTRA	MEDIOS DE PURIFICACIÓN		
		AGAR PELLETS	SINGH	STANIER MODIFICADO
1	Z1A	4S	-	-
2	Z1B	3N	2N	-
3	Z2A	6S	-	-
4	Z3A	4N	3S	-
5	Z3B **	3N	-	-
6	Z6A	2S	-	-
7	Z6B	* 4N	3S	-
8	Z7A	3S	-	-
9	Z7B	4S	-	-
10	Z8A **	6N	3N	-
11	Z8B	4S	-	-
12	Z9A	2S	-	-
13	Z9B	6N	5N	-
14	Z10A	3S	-	-
15	Z11A	5S	-	-
16	Z12A	3S	-	-
17	Z12B	4N	3S	-
18	Z13A	* 5S	-	-
19	Z14A	1S	-	-
20	Z14B	4N	3S	-
21	Z14C	2N	2S	-
22	Z15A	2S	-	-
23	Z16A	2S	-	-
24	Z17A	3S	-	-
25	Z17B	4N	6S	-
26	Z19A			* 7N
27	Z20A	6S	-	-

\* Purificadas nuevamente a partir de los medios de aislamiento

\*\* Se realizó nuevo aislamiento y la muestra dio negativo.

- Negativo

N no se pudo purificar a pesar de los repetidos procesos realizados indicados por los números que lo acompañan.

S si se pudo purificar, las repeticiones en el proceso están indicados por los números que lo acompañan.

TABLA N° 10. Purificación de cepas provenientes de medios de aislamientos de muestras de Jardines de Lima

N°	MUESTRA	MEDIOS DE PURIFICACIÓN		
		AGAR PELLETS	SINGH	STANIER MODIFICADO
1	J1A	4S	-	-
2	J2A	3S	-	-
3	J2B	* 6N	3S	-
4	J3A	3N	2S	-
5	J3B	2S	-	-
6	J4A	3S	-	-
7	J5A	- 11N	8S	-
8	J6A	4N	5S	-
9	J7A	-	-	4S
10	J8A	6S	-	-
11	J8B	5S	-	-
12	J9A	4S	-	-
13	J9B	- 8N	- 7N	-
14	J11A	3S	-	-
15	J12A	1S	-	-
16	J12B	6N	5S	-
17	J12C	4N	4S	-
18	J13A	* 8N	* 7N	-
19	J13B	* 9N	6S	-
20	J14A	6N	5S	-
21	J14B	5N	4S	-
22	J14C	* 5N	* 7N	-
23	J15A	3S	-	-
24	J16A	4N	3S	-
25	J16B	3S	-	-
26	J16C	5S	-	-
27	J17A	2S	-	-
28	J18A	4S	-	-
29	J19A	4S	-	-
30	J20A	2S	-	-
31	J21A	2S	-	-
32	J21B	* 10N	6N	-

\* Purificadas nuevamente a partir de los medios de aislamiento

- Negativo

N no se pudo purificar a pesar de los repetidos procesos realizados indicados por los números que lo acompañan.

S si se pudo purificar, las repeticiones en el proceso están indicados por los números que lo acompañan.

TABLA N° 11. Purificación de cepas provenientes de medios de aislamientos de muestras de Lomas de Lachay.

Nº	MUESTRA	MEDIOS DE PURIFICACIÓN		
		AGAR PELLETS	SINGH	STANIER MODIFICADO
1	L2A	* 7N	* 11N	-
2	L4A	2S	-	-
3	L5A	3S	-	-
4	L5B	6N	* 4S	-
5	L5C	-	-	7S
6	L6A	5S	-	-
7	L6B	* 10N	5S	-
8	L8A	4S	-	-
9	L9A	- 9N	* 7N	-
10	L10A	6N	4S	-
11	L10B	5S	-	-
12	L10C	* 8N	6N	-
13	L10D **	4N	7N	-
14	L10E	3N	* 5S	-
15	L11A	7N	5S	-
16	L12A	5S	-	-
17	L12B	* 11N	* 8N	-
18	L13A	7N	4S	-
19	L13B	8N	5S	-
20	L16A	5S	-	-
21	L17A	3S	-	-
22	L18A	4N	* 5S	-
23	L18B	6N	4S	-
24	L19A	2S	-	-
25	L19B	- 6N	- 7N	-
26	L20A	3S	-	-
27	L20B	4S	-	-

\* Purificadas nuevamente a partir de los medios de aislamiento

\*\* Se realizó nuevo aislamiento y la muestra dio negativo.

- Negativo

N no se pudo purificar a pesar de los repetidos procesos realizados indicados por los números que lo acompañan.

S si se pudo purificar, las repeticiones en el proceso están indicados por los números que lo acompañan.

TABLA N° 12. Purificación de cepas provenientes de medios de aislamientos de muestras de Lunahuaná

N°	MUESTRA	MEDIOS DE PURIFICACIÓN		
		AGAR PELLETS	SINGH	STANIER MODIFICADO
1	LH1A	5N	3N	-
2	LH2A	3S	-	-
3	LH3A	4S	-	-
4	LH3B	* 6S	-	-
5	LH4A	2S	-	-
6	LH5A	1S	-	-
7	LH5B	2S	-	-
8	LH7A	2S	-	-
9	LH7B	4N	3S	-
10	LH8A	4S	-	-
11	LH8B	3S	-	-
12	LH8C	* 6S	-	-
13	LH9A	4S	-	-
14	LH9B	6S	-	-
15	LH10A	3S	-	-
16	LH11A	5S	-	-
17	LH12A	4S	-	-
18	LH13A	* 9N	- 8N	-
19	LH13B	7N	9N	-
20	LH14A	3S	-	-
21	LH15A	3S	-	-
22	LH15B	4S	-	-
23	LH17A	* 5S	-	-
24	LH18A	4N	3S	-
25	LH20A	4S	-	-
26	LH20B	4S	-	-

\* Purificadas nuevamente a partir de los medios de aislamiento

- Negativo

N no se pudo purificar a pesar de los repetidos procesos realizados indicados por los números que lo acompañan.

S si se pudo purificar, las repeticiones en el proceso están indicados por los números que lo acompañan.

TABLA N° 13. Purificación de cepas provenientes de medios de aislamientos de muestras del Valle del Chillón.

N°	MUESTRA	MEDIOS DE PURIFICACIÓN		
		AGAR PELLETS	SINGH	STANIER MODIFICADO
1	V1A	4S	-	-
2	V1B	3S	-	-
3	V2A	7S	-	-
4	V2B **	6N	5N	-
5	V2C	7N	* 8N	-
6	V3A	* 6S	-	-
7	V3B	4S	-	-
8	V3C	3S	-	-
9	V4A	2S	-	-
10	V5A	2S	-	-
11	V6A	1N	2S	-
12	V6B	2S	-	-
13	V7A	3S	-	-
14	V7B	4S	-	-
15	V8A	2S	-	-
16	V8B	7N	* 5N	-
17	V9A	5S	-	-
18	V9B	3S	-	-
19	V9C	-	-	4S
20	V10A	3N	2S	-
21	V10B	5S	-	-
22	V10C	3S	-	-
23	V10D	-	-	5N
24	V11A	2N	2S	-
25	V11B	-	-	4S
26	V12A	4S	-	-
27	V12B	3S	-	-
28	V12C	- 11N	- 6N	-
29	V13A	4S	-	-
30	V13B	2S	-	-
31	V13C	2S	-	-
32	V13D	-	-	4N
33	V14A	3S	-	-
34	V14B	2S	-	-
35	V14C	2S	-	-
36	V15A	3S	-	-
37	V15B **	9N	5N	-
38	V16A	2N	3S	-
39	V16B	2S	-	-
40	V16C	3S	-	-
41	V16D	4S	-	-
42	V17A	2S	-	-
43	V17B	1S	-	-
44	V18A	3S	-	-



45	V18B	7N	6N	-
46	V19A	4S	-	-
47	V19B	2S	-	-
48	V20A	3S	-	-
49	V20B	-	-	* 3N
50	V21A	2S	-	-
51	V21B	3S	-	-
52	V21C	2S	-	-
53	V21D **	7N	6N	-

\* Purificadas nuevamente a partir de los medios de aislamiento

\*\* Se realizó nuevo aislamiento y la muestra dio negativo.

- Negativo

N no se pudo purificar a pesar de los repetidos procesos realizados indicados por los números que lo acompañan.

S si se pudo purificar, las repeticiones en el proceso están indicados por los números que lo acompañan.

### 5.3. OBTENCIÓN DE FORMAS VEGETATIVAS

Cuando se realizó la purificación de las cepas se procedió a comprobar su pureza mediante la introducción de los cuerpos fructificantes de mixobacterias en el caldo BHI, pues las mixobacterias no crecen en estos medios mientras que los contaminantes si lo hacen por lo cual el medio usado se vuelve turbio, y en este caso estas cepas se continuaron purificando. Luego de realizar una purificación completa se sometió a algunas cepas que planteaban dudas para su identificación a medios más enriquecidos para observar el comportamiento cultural y así determinar las características de la cepa problema y dar un diagnóstico más exacto.

Luego de obtener 137 cepas purificadas, éstas se sembraron en los respectivos medios de crecimiento vegetativo según el medio de purificación utilizado siempre considerando la naturaleza nutritiva: Los bacteriolíticos procedentes de los medios Agar Pellets o Agar Singh, fueron sembrados en Agar Levadura (133 cepas) y cuando no crecieron en este medio se sembraron nuevamente en Agar Pt (17 cepas) para la obtención de la forma vegetativa; las cepas purificadas en Agar Stanier Modificado, supuestas bacteriolíticas, fueron sembradas en el Medio IM-1 PAPEL (4 cepas) para obtener las formas vegetativas y las características de la colonia.

Cabe indicar que en esta fase se anotaron las características culturales como la forma del enjambre en la placa de Petri, la coloración Gram de éste, y sobre todo la absorción del rojo de congo. Con esta reacción se pueden diferenciar generos del suborden Cystobacterineae (bacteriolíticos), que sí absorben el rojo congo, del

suborden Sorangineae (muchos de ellos celulolíticos) que no lo hacen. Los resultados obtenidos se describen en las Tablas 14-18.

TABLA N° 14. Características de las cepas de Mixobacteriales purificadas a partir de suelos de Los Bosques de Zárate en sus fases de crecimiento.

Nº	CEPA PURIFICADA	CÉLULA VEGETATIVA	MIXOSPORA	CUERPO FRUCTIFICANTE	GÉNERO IDENTIFICADO
1	Z1A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
2	Z2A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
3	Z3A	-	-	VARIOS	<i>Cystobacter</i>
4	Z6A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
5	Z6B	GRUPO 1	BARRA	VARIOS	<i>Angiococcus</i>
6	Z7A	GRUPO 1	BARRA	VARIOS	<i>Cystobacter</i>
7	Z7B	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
8	Z8B	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
9	Z9A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
10	Z10A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
11	Z11A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
12	Z12A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
13	Z12B	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
14	Z13A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
15	Z14A	-	-	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
16	Z14B	GRUPO 1	OVOIDE	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
17	Z14C	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
18	Z15A	-	-	VARIOS	<i>Cystobacter</i>
19	Z16A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
20	Z17A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
21	Z17B	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
22	Z20A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>

TABLA Nº 15. Características de las cepas de Mixobacteriales purificadas a partir de Los Jardines de Lima, en sus fases de crecimiento.

Nº	CEPA PURIFICADA	CÉLULA VEGETATIVA	MIXOSPORA	CUERPO FRUCTIFICANTE	GÉNERO IDENTIFICADO
1	J1A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
2	J2A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
3	J2B	-	-	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
4	J3A	GRUPO 1	OVOIDE	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
5	J3B	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
6	J4A	-	-	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
7	J5A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
8	J6A	GRUPO 1	BARRA	VARIOS	<i>Cystobacter</i>
9	J7A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
10	J8A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
11	J8B	-	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
12	J9A	GRUPO1	-	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
13	J11A	-	-	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
14	J12A	GRUPO 1	OVOIDE	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
15	J12B	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
16	J12C	GRUPO 1	BARRA	VARIOS	<i>Cystobacter</i>
17	J13B	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
18	J14A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
19	J14B	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
20	J15A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
21	J16A	-	-	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
22	J16B	GRUPO 1	BARRA	VARIOS	<i>Cystobacter</i>
23	J16C	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
24	J17A	GRUPO 1	BARRA	ÚNICO	<i>Cystobacter</i>
25	J18A	GRUPO 1	-	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
26	J19A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
27	J20A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
28	J21A	GRUPO 1	BARRA	VARIOS	<i>Cystobacter</i>

TABLA Nº16. Características de las cepas de Mixobacteriales purificadas a partir de suelos de Lomas de Lachay en sus fases de crecimiento.

Nº	CEPA PURIFICADA	CÉLULA VEGETATIVA	MIXOSPORA	CUERPO FRUCTIFICANTE	GÉNERO IDENTIFICADO
1	L4A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
2	L5A	-	-	ÚNICO	<i>Cystobacter</i>
3	L5B	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
4	<b>L5C</b>	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
5	L6A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
6	L6B	GRUPO 2	CADENA	ÚNICO	<i>Sorangium</i>
7	L8A	GRUPO 1	BARRA	ÚNICO	<i>Cystobacter</i>
8	L10A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
9	L10B	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
10	L10E	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
11	L11A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
12	L12A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
13	L13A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
14	L13B	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
15	L16A	GRUPO 1	BARRA	ÚNICO	<i>Cystobacter</i>
16	L17A	GRUPO 1	OVOIDE	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
17	L18A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
18	L18B	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
19	L19A	-	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
20	L20A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
21	L20B	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>

TABLA N° 17. Características de las cepas de Myxobacterales purificadas a partir de suelos de Lunahuaná en sus fases de crecimiento.

Nº	CEPA PURIFICADA	CÉLULA VEGETATIVA	MIXOSPORA	CUERPO FRUCTIFICANTE	GÉNERO IDENTIFICADO
1	LH2A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
2	LH3A	-	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
3	LH3B	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Archangium</i>
4	LH4A	-	-	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
5	LH5A	GRUPO 1	OVOIDE	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
6	LH5B	GRUPO 1	OVOIDE	ÚNICO	<i>Cystobacter</i>
7	LH7A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
8	LH7B	-	-	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
9	LH8A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
10	LH8B	GRUPO 2	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Cystobacter</i>
11	LH8C	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
12	LH9A	-	-	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
13	LH9B	GRUPO 1	OVOIDE	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
14	LH10A	-	-	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
15	LH11A	GRUPO 1	BARRA	ÚNICO	<i>Cystobacter</i>
16	LH12A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
17	LH14A	-	-	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
18	LH15A	-	-	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
19	LH15B	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
20	LH17A	-	-	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
21	LH18A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
22	LH20A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
23	LH20B	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>

TABLA Nº 18. Características de las cepas de Mixobacteriales purificada a partir de suelos de Valle del Chillón en sus fases de crecimiento.

Nº	CEPA PURIFICADA	CÉLULA VEGETATIVA	MIXOSPORA	CUERPO FRUCTIFICANTE	GÉNERO IDENTIFICADO
1	V1A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
2	V1B	GRUPO 1	-	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
3	V2A	-	-	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
4	V3A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
5	V3B	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
6	V3C	GRUPO 2	ESFÉRICA	VARIOS	<i>Sorangium</i>
7	V4A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
8	V5A	-	-	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
9	V6A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
10	V6B	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
11	V7A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
12	V7B	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
13	V8A	-	-	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
14	V9A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
15	V9B	GRUPO 1	BARRA	VARIOS	<i>Cystobacter</i>
16	<b>V9C</b>	GRUPO 2	IRREGULAR	ÚNICO CON TALLO	<i>Stigmatella</i>
17	V10A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
18	V10B	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
19	V10C	GRUPO1	-	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
20	V11A	-	-	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
21	<b>V11B</b>	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
22	V12A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
23	V12B	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
24	V13A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
25	V13B	GRUPO 1	-		<i>Myxococcus</i>
26	V13C	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
27	V14A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
28	V14B	-	-	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
29	V14C	-	-	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
30	V15A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
31	V16A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
32	V16B	GRUPO 1	BARRA	ÚNICO	<i>Cystobacter</i>

33	V16C	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
34	V16D	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
35	V17A	-	-	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
36	V17B	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
37	V18A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
38	V19A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
39	V19B	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
40	V20A	GRUPO 1	BARRA	ÚNICO	<i>Cystobacter</i>
41	V21A	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
42	V21B	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>
43	V21C	GRUPO 1	ESFÉRICA	ÚNICO	<i>Myxococcus</i>

#### 5.4. IDENTIFICACIÓN DE CEPAS

Desde el aislamiento inicial en la que se obtuvo la fase quística de las myxobacterias, se fue anotando las características culturales de cada una de las 165 cepas obtenidas en esta etapa. Características tales como forma, color consistencia, y al realizar un *Squash* de ésta ver la forma de las myxosporas.

También se procedió a tomar datos de la fase vegetativa de las 137 cepas purificadas como la absorción del rojo congo, forma y tamaño de las células mediante un prueba de Gram. En unos pocos casos se utilizó pruebas bioquímicas para determinar su clasificación final, sobre todo para la diferenciación de especies de *Myxococcus*, tales pruebas fueron: caseína, almidón, oxidasa, esculina y úrea.

La Tabla 19 resume el total del trabajo realizado en relación a la identificación de los aislados de las diferentes zonas de Lima: 113 fueron identificados a nivel de género y especie (identificación completa), 40 se identificaron a nivel de género (identificación incompleta) y 12 no se pudieron identificar. La Tabla 20 describe todas las mixobacterias identificadas ubicándolas de acuerdo a las zonas muestreadas, algunas de estas cepas pueden observarse en el Anexo B (Figuras 2-20).

TABLA N°19. Cepas de myxobacterias aisladas e identificadas en forma completa, parcial o no identificadas.

LUGAR DE LA MUESTRA	CEPAS AISLADAS	IDENTIFICACIÓN COMPLETA	IDENTIFICACIÓN INCOMPLETA	CEPAS SIN IDENTIFICAR
BOSQUES DE ZARATE	27	17	8	2
JARDINES DE LIMA	32	22	9	1
LOMAS DE LACHAY	27	19	6	2
LUNAHUANA	26	18	7	1
PANTANOS DE VILLA	0	0	0	0
VALLE DEL CHILLON	53	37	10	6
TOTAL	165	113	40	12



TABLA N°20. Géneros y especies de Mixobacterias que se identificaron en esta investigación. No se incluye Pantanos de Villa por no aislarse ninguna cepa en este lugar.

MIXOBACTERIAS	BOSQUES DE ZARATE	JARDINES DE LIMA	LOMAS DE LACHAY	LUNAHUANA	VALLE DEL CHILLÓN
<b>SUB ORDEN CYSTOBACTERINEAE</b>	25	31	24	25	46
GÉNERO <i>Cystobacter</i>	4	6	3	3	3
<i>Cystobacter. ferrogineus</i>	1	-	1	1	1
<i>Cystobacter fuscus</i>	-	2	1	-	1
<i>Cystobacter sp</i>	3	4	1	1	1
GÉNERO <i>Archangium</i>	-	-	-	1	1
<i>Archangium gephyra</i>	-	-	-	1	1
GÉNERO <i>Myxococcus</i>	20	25	21	21	40
<i>Myxococcus fulvus</i>	8	10	10	5	12
<i>Myxococcus virescen</i>	2	2	3	2	9
<i>Myxococcus xanthus</i>	6	8	4	10	12
<i>Myxococcus sp</i>	4	5	4	4	5
GÉNERO <i>Stigmatella</i>					1
<i>Stigmatella sp</i>					1
GÉNERO <i>Angiococcus</i>	1	-	-	-	1
<b>SUB ORDEN SORANGINEAE</b>	-	-	1	-	1
GÉNERO <i>Sorangium</i>	-	-	1	-	2
IDENTIFICACIÓN COMPLETA	17	22	19	18	37
IDENTIFICACIÓN INCOMPLETA	8	9	6	7	10
SIN IDENTIFICAR	2	1	2	1	6
TOTAL CEPAS AISLADAS	27	32	27	26	53

## VI. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó la ocurrencia de microorganismos del Orden Myxococcales, en suelos de Lima. La finalidad de esta investigación fue la determinación de la presencia de este importante grupo microbiano, y los géneros que predominan en nuestro medio, como una contribución y aporte a los escasos trabajos realizados al respecto para sentar las bases para la realización de futuros trabajos principalmente en el área biotecnológica (Rolf *et al.*, 1985; Reichenbach *et al.*, 1988; Reichenbach & Hofle, 1998).

Las muestras fueron colectadas en 6 zonas diferentes tratando de abarcar la mayor variedad de ambientes presentes en la región Lima. Las zonas fueron descritas de acuerdo al tipo de suelo, describiéndose el entorno biológico principalmente la presencia de material orgánico y el agua utilizada para su irrigación. La descripción que se ha hecho siempre de este microorganismo generalmente los asocia a ecosistemas terrestres cubiertos de hojarasca en proceso de descomposición (Singh, 1947; Reichenbach, 2005), actualmente se conoce su importante papel en la mineralización de compuestos orgánicos (Jimenez-Lopez *et al.*, 2007).

Para el aislamiento inicial, se tomó como base la utilización de medios tradicionales, como son K&K, Singh y Stanier, para luego usar medios más enriquecidos. Los medios anteriormente relatados son generalmente utilizados de manera rutinaria y han sido recomendados por varios autores (Reichenbach, 1970; Bretscher & Kaiser, 1978; Arias *et al.*, 1979; Ruiz *et al.*, 1987).

Por la experiencia adquirida en el aislamiento, podemos afirmar que el medio K&K es el más ventajoso por ser el de más fácil preparación, pues sólo requiere de la muestra de suelo humedecida y de estiércol (*pellets*) de conejo; es versátil, porque permite aislar la mayoría de cepas de mixobacterias, y económico, por sus componentes, suelo y estiércol de conejo. Además, el Medio K&K ofrece menor riesgo de contaminación para el manipulador a diferencia del medio Singh que en su preparación utiliza una cepa de *E. coli* que es altamente infectiva, siendo por ello el más recomendado por diversos autores para el aislamiento primario (Peterson, 1969; Ramirez, 1991).

Para el aislamiento inicial se utilizó el medio K&K realizándose la siembra de las muestras de suelo por duplicado. Las muestras que resultaron negativas en este medio se sembraron en el Medio Singh de igual manera hasta por dos veces, ya que las mixobacterias de naturaleza nutricional bacteriolítica se ven más favorecidas en este medio. Los resultados obtenidos con la utilización de estos medios nos permiten asegurar que ambos métodos deben ser utilizados en el aislamiento de mixobacterias bacteriolíticas.

Es cierto que en presente trabajo no podemos comprobar qué método es el que aporta mejores resultados para el aislamiento de mixobacterias, ya que se utilizó el medio K&K inicialmente y el Medio Singh como alternativa al crecimiento negativo en el medio anteriormente mencionado. En todo caso éste no fue el objetivo primordial del trabajo, pero por referencia bibliográfica y ensayos realizados anteriormente ambos dan resultados semejantes (Dworkin, 1962; Peterson, 1969).

El bajo número de cepas de mixobacterias aisladas del medio Stanier, creemos que se debe principalmente a que los suelos analizados no son los más adecuados para la vida de las mixobacterias con actividad celulolítica, pues se favorece mejor el aislamiento de muestras de estiércol de ganado y madera en descomposición; aunque algunas cepas bacteriolíticas si pueden crecer en este medio (experiencia personal). La mayoría de cepas aisladas en este medio provenían de tierras de cultivo del Valle del Chillón.

Las muestras procedentes de Los Pantanos de Villa, dieron resultados negativos en el aislamiento de mixobacterias, por lo cual podemos afirmar que es un suelo poco apropiado para el crecimiento de este grupo bacteriano; el poco oxígeno que contiene este suelo impediría la proliferación de mixobacterias y su microflora acompañante. Es probable que esta muestra tenga una elevada salinidad debido a su cercanía al mar; se ha reportado una tolerancia a la salinidad en valores por debajo al 1% (Reichenbach & Dworkin, 1992). Recientemente se han descrito mixobacterias marinas con halotolerancia e inclusive halófilas (Iizuka *et al.*, 1988; Yu-qing *et al.*, 2005) pero cabe resaltar que los medios de aislamiento utilizados en este estudio no contienen NaCl, aunque aún así se hubieran podido aislar mixobacterias halotolerantes si hubieran estado presentes en la muestra.

Durante la etapa de purificación se sembraron las cepas aisladas en medios más selectivos repetidamente hasta obtener su purificación total, para lo cual las

cepas bacteriolíticas aisladas a partir de los medios K&K y Singh se purificaron en medio Agar Pellets las veces que fueron necesarias; en el caso de fracasar la purificación en los medios antes descritos, se procedió a utilizar como alternativa el Medio Singh.

Se usó el medio agar Pellets en el procedimiento de purificación por ser un medio de bajo costo, fácil, de rápida preparación y de bajo riesgo. Su uso es simultáneo todas las veces que fueron consideradas necesarias, pues cuando se asumía a simple vista que los cultivos estaban puros se sembraban en agar Luria y/o BHI para su verificación; si la cepa estaba pura, el medio se mantenía claro porque tan solo los contaminantes crecen en estos medios.

Debemos indicar que durante el proceso de purificación se tuvo que recurrir en muchas oportunidades a sembrar de nuevo las muestras en placas nuevas de agar Pellets o Singh, ya que las sembradas para su purificación no crecían o se perdían por efecto de la contaminación. En otros pocos casos se procedió a un nuevo aislamiento a partir de las muestras. El proceso de purificación es desde ya el paso más difícil en el aislamiento de mixobacterias debido al tipo de muestras de las cuales se obtienen, generalmente acompañados por una enorme concentración de microorganismos que compiten de igual manera por el mismo substrato (McCurdy, 1969; Peterson, 1969).

Se lograron purificar un total de 137 cepas, las cuales se procedió a guardar en cepario con el medio agar pellets y agar MEC, para su utilización en posteriores pruebas. No se lograron purificar 28 cepas, pero algunas de ellas pudieron ser clasificadas por caracteres morfológicos. También se debe indicar que en el medio agar pellets se resembraron 16 cepas a partir de la placa de aislamiento, 5 se tuvieron que aislar nuevamente para su purificación en este medio; mientras que en el medio Singh se tuvieron que resembrar 15 cepas a partir de las placas de aislamiento.

Las cepas de naturaleza celulolítica aisladas a partir del medio Stanier, en total 9 cepas (5.5% del total de cepas aisladas), se purificaron en el medio Stanier modificado, consiguiéndose purificar 4 de ellas. Si bien es cierto que se procedió al sembrado para la purificación a partir de la placa de aislamiento inicial por duplicado, estas 5 en ningún momento se lograron purificar de esta manera, pues tal vez no eran de naturaleza celulolítica ya que se sabe que algunas cepas bacteriolíticas también esporádicamente pueden crecer sobre papel filtro, que tiene el medio Stanier. Además, en este medio las bacterias crecen lentamente, por lo cual los contaminantes

y la falta de humedad muchas veces son elementos adversos para el desarrollo de las myxobacterias.

A pesar de de los múltiples cuidados de asepsia en la manipulación de las muestras, y el uso de Nistatina en el aislamiento y luego Cicloheximide en la purificación y posteriores etapas, siempre la contaminación por mohos, levaduras, parásitos, semillas y otros fue un elemento perjudicial en la etapa de aislamiento y purificación, sobre todo porque el suelo, como muestra, es el nicho de múltiples comunidades microbianas, además del lento crecimiento que caracteriza a las mixobacterias que propició el desarrollo de otros organismos de crecimiento más rápido. También se realizaron ensayos con 20 cepas para la purificación en cultivos líquidos a temperaturas de 57°C, pero el resultado fue siempre negativo.

La caracterización de cepas de mixobacterias se realizó empleando las características morfológicas, desde el primer momento de su aislamiento, para ello se recurrió a la observación de cepas purificadas, luego se sometió a las cepas, que planteaban algún problema, a la fase vegetativa, lográndose sembrar 85 cepas para obtener formas vegetativas, en los medios Pt y agar levadura para las cepas puras de naturaleza bacteriolítica, y 4 cepas de naturaleza celulolítica en el medio IM-1 papel. En esta fase se observó características como Gram, reacción al rojo congo, desplazamiento de la colonia sobre el agar. En realidad no fue necesario someter a todas las cepas a estos medios y pruebas porque en la fase quística muchas de éstas, mostraron características morfológicas marcadas para la identificación de especie.

Luego de la fase vegetativa aún algunas cepas presentaban dudas para su clasificación final, por lo que fue necesario someterlas a pruebas bioquímicas que permitieron decidir su ubicación taxonómica, estas pruebas fueron oxidasa, catalasa y se realizaron a partir de la fase vegetativa; fueron un total de 25 cepas las sometidas a estas pruebas. También se sometieron 13 cepas al sembrado en medio líquido, medio CT, para visualizar su comportamiento cultural.

Si nos ponemos analizar la presencia de myxobacterias por zonas de muestreo debemos indicar que las muestras de la zona del Valle del Chillón aportaron más cepas aisladas, un total de 53 cepas (32.1%). La razón que proponemos es que son terrenos que están en constante renovación por lo cual tienen mayor aireación y por lo tanto oxígeno disponible, además de la abundante carga bacteriana que éstas contienen por ser regadas con aguas servidas. Entretanto de las muestras de la zona

de las Lomas de Lachay y Bosque de Zárate se obtuvo menor número de cepas, probablemente debido a que éstas provienen de suelos que tienen una irrigación natural y muchas veces escasa. Los resultados finales corroboraron estas observaciones con la incidencia de una mayor abundancia de especies en suelos regados con aguas contaminadas o servidas.

Se identificó a nivel de especie un total de 113 cepas y 40 en forma incompleta (sólo género). Se debe señalar también que 128 cepas se ubicaron dentro del género *Myxococcus* con lo que se demuestra que, al igual que en otros suelos del mundo, en Lima también predomina este grupo (Shimkets, 1990; Karwowsky *et al.*, 1996; Jaeyoung *et al.*, 2009).

En nuestro país no se han realizado trabajos de aislamiento e identificación de Mixobacterias con excepción del reportado por Ramírez (1991) en el que sólo se estandarizan algunos métodos de aislamiento y se estudian únicamente aislados provenientes de muestras de suelos de cultivo. Los resultados que presentamos son los primeros en considerar diferentes condiciones de vida para este importante grupo microbiano en la ciudad de Lima, así como el reporte de los géneros más representativos como son: *Myxococcus*, *Cystobacter*, *Archangium*, *Stigmatella*, *Angiococcus* y *Sorangium*. El presente trabajo también da las pautas para el estudio de estos organismos con fines biotecnológicos.

## VII. CONCLUSIONES

1. Se corroboró la presencia de Myxococcales en suelos de Lima, siendo las cepas bacteriolíticas las más predominantes.
2. El género *Myxococcus* fue el de mayor predominancia.
3. El medio K&K resultó ser el método más eficaz para el aislamiento primario de mixobacterias.
4. Se aislaron muy pocas cepas de naturaleza celulolítica, debido a que los suelos analizados no son los más adecuados para la proliferación de este grupo de Myxococcales.
5. El medio Agar Pellets resultó ser el más eficaz para la purificación de cepas de *Myxococcus*.
6. El género *Myxococcus* se asocia a suelos altamente oxigenados y sobre todo regados con aguas que contienen alta carga microbiana.
7. La más alta diversidad de mixobacterias, correspondiente a los seis géneros reportados en este estudio, fue encontrada en muestras tomadas en el valle del río Chillón.
8. Se reporta por primera vez para la ciudad de Lima, los géneros *Cystobacter*, *Archangium*, *Stigmatella*, *Angiococcus* y *Sorangium*.

## **VIII. RECOMENDACIONES**

- Continuar con las investigaciones en diversos temas básicos y en temas específicos respecto a especies del Orden Myxobacterales.
- El uso para el aislamiento de especies de naturaleza bacteriolíticas de este grupo del medio K&K.
- El uso del medio Agar Pellets para la purificación de especies de este grupo.
- Se hace necesario también desarrollar investigación biotecnológica sobre este grupo microbiano con el fin de determinar metabolitos de interés industrial.



## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARIAS, J.M.; RODRÍGUEZ, C AND MONTOYA. Purification and partial characterization of an antibiotic from *Myxococcus coralloides*. *J. Antibiotic* 1979, vol. 32, p. 205-211.
2. BRETSCHER, A. P AND DALE KAISER. Nutrition of *Myxococcus xanthus* a fruiting myxobacterium. *J. Bacteriology* 1978, vol.33, n°2, p. 763-768.
3. BROCKMAN, E.R. Myxobacterias from Arid Mexican Soil. *Appl Environ Microbiol* 1976, vol. 32, p. 642-644.
4. BROWN, N. L & PARISH J. H. Extrachromosomal DNA in chloramphenicol resistant *Myxococcus* strains. *J. Gen Microbiology* 1976, vol. 93, p. 63-68.
5. DAOUD, N.N. & FOSTER, H.A. Antifungal activity of *Myxococcus* species. 2 Production, purification and physicochemical properties of antibiotics from *Myxococcus xanthus* S111 (Myxobacterales). *Biomed. Lett.* 1993, vol. 189, p. 59-64.
6. DAWID, W; GALLIKOWSKI, C.A AND HIRSCH, P. Psychrophilic myxobacteria from Antarctic soils. *Polarforschung* 1988, vol. 58, p. 271-278.
7. DWORKIN, M. Nutritional requirements for vegetative growth of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriology* 1962, vol. 84, p. 250-257.
8. DWORKIN, M AND KAISER, D. Myxobacteria II. Washington, DC: American Society for Microbiology Press 1993. 404 p.
9. DWORKIN, M. Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol Rev* 1996, vol. 60, p. 70-102.
10. ENSIGN, JC & WOLFE, RS. Lysis of Bacterial Cell Walls by an Enzyme Isolated from a *Myxobacter*. *J Bacteriol* 1965, vol. 90, n° 2, p. 395-402.

11. FREESE, A; REICHENBACH H, AND LUNDSORF, H. Further characterization and in situ localization of chain-like aggregates of the gliding bacteria *Myxococcus fulvus* and *Myxococcus Xanthus*. *J Bacteriology* 1997, vol. 179, p. 1246-1252.
12. GARRITY, GEORGE M; BELL J. AND LILBURN Timothy G. 2004. Taxonomic Outline of the Prokariotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2da Ed. U.S.A. pp.399.
13. GERTH, K., H. IRSCHIK, H. REICHENBACH, AND W. TROWITZSCH. The myxovirensins, a family of antibiotics from *Myxococcus virescens* (Myxobacterales). *J. Antibiot.* 1982., vol. 35, p.1454–1459.
14. GERTH, K; BEDORF, N; IRSCHIK, H; HOFLE, G, AND REICHENBACH, H. The soraphens: a family of novel antifungal compounds from *Sorangium cellulosum* (myxobacteria. I. Soraphen A1alfa: fermentation, isolation, biological properties. *J Antibiotic* 1994, vol. 47, p. 23-31.
15. GERTH K; BEDORF N.; HOFLE G; IRSCHIK H. Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Soramgium cellulosum* (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot* 1996, vol. 49, p. 560-563.
16. HOOK, L. A. Distribution of myxobacters in aquatic habitats of an alkaline bog. *Appl. Environ. Microbiol* 1977, vol. 34, p. 333-335.
17. HOLT JHON G; KRIEG NOEL R; SNEATH PETER H.A; STALEY JAMES T. AND STANLEY T. WILLIAMNS. 1994. BERGEY'S Manual of Determinate Bacteriology 9na Ed. EDITION.U.S.A. pp 787.
18. FOSTER, HOWARD A.; YASOURI, FAZEL N.; DAOUD, NABEEL N. Antibiotic activity of soil myxobacteria and its ecological implications. *FEMS Microbiology Letters* 1992, vol. 101, p. 27–32.
19. HULL, W.E. BERKESSEL, A., AND PLAGA, W. Structure elucidation an chemical synthesis of stigmolone, a novel type of prokaryotic pheromone. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1988, vol. 5, p.11268-11273.

20. IRSCHIK, H., K. GERTH, T. KEMMER, H. STEINMITZ AND REICHENBACH. The Myxoalargina, new peptide antibiotics from *Myxococcus fulvus*: 1. Cultivation, isolation, and some chemical and biological properties. *J. Antibiotic. Tokio* 1983, vol. 36, n°1, p. 6-12.
21. IRSCHIK, H ; JANSEN, H; GERTH, K; HOFLE, G; REICHENBACH, H. The sorangicins, novel and powerful inhibitors of eubacterial RNA polymerase isolated from myxobacteria. *J. Antibiotic.* 1987, vol. 40, p. 7-13.
22. IRSCHIK H, AUGUSTINIAK H, GERTH K, HÖFLE G, REICHENBACH H. The ripostatins, novel inhibitors of eubacterial RNA polymerase isolated from Myxobacteria. *J Antibiotic.* 1995, vol. 48, p.787-792
23. IRSCHIK, H; SCHUMMER, D; HOFLE, G; REICHENBACH, H. The tartrolons, new boron-containing antibiotics from a myxobacterium, *Sorangium cellulosum*. *J Antibiot (Tokyo)* 1995, vol. 48, n° 1, p. 26-30.
24. IIZUKA, T; JOJIMA, Y; YAMANAKA, S. Isolation of Myxobacteria from the marine environment. *FEMS Microbiology Letters* 1988, vol. 169, p. 317 – 322.
25. JIMENEZ-LOPEZ, C., JROUNDI, F., RODRÍGUEZ-GALLEGO, M., ARIAS, J.M., and GONZALEZ-MUÑOZ, M.T. Biomineralization induced by Myxobacteria *In* MÉNDEZ-VILAS, A. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology 2007, vol.1, p.143-154.
26. KAISER, D. Signaling in Myxobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 2004, vol. 58, p. 75 -98.
27. KARWOWSKI, J P, SUNGA, G N, KADAM, S. AND MCALPINE, J B REICHENBACH, H. A method for the selective isolation of *Myxococcus* directly from soil. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 1996, vol.16, n° 4, p. 230-236.
28. KIM, Y; FURIHATA, K; YAMANAKA, S; FUDO, R; SETO, H. Isolation and structural elucidation of stipiamide, a new antibiotic effective to multidrug-resistant cancer cells. *J Antibiot.* 1991, vol. 44, p. 553-556.

29. KUNZE, B; JANSEN, R; PRIDZUN, L; JURKIEWICZ, E; HUNSMANN, G; HOFLE, G; REICHENBACH, H. Phenoxan, a new oxazole-pyrone from myxobacteria: production, antimicrobial activity and its inhibition of the electron transport in complex I of the respiratory chain. *J Antibiot.* 1992, vol. 45, p. 1549-1552.
30. KUNDIM B, ITOU Y; SAKAGAMI, Y; FUDOU, R; IIZUKA, T.; YAMANAKA, S.; OJIKI, M. New haliangicin isomers, potent antifungal metabolites produced by a marine myxobacterium. *J Antibiot.* 2003, vol. 56, p. 630-638.
31. KUNZE, B.; KOHL, W.; HOFLE, G.; AND REICHENBACH, H. Production, isolation, physico-chemical and biological properties of angiolum A, a new antibiotic from *Angiococcus disciformis* (Myxobacteriales). *J Antibiot.* 1985, vol. 38, p. 1649-1654.
32. KUNZE, B.; BRIGITTE, GERARH HOFLE AND REICHENBACH, HANS. The Aurachins, new quinoline antibiotic from Myxobacteria. Production, physicochemical and biology properties. *J. Antibiotic. Tokio* 1987, vol.40, p. 258-265.
33. KUNZE, B.; TROWITZSCH, KIENAST W.; HOFLE, G. & REICHENBACH, H. Nannochelins A, B and C, new iron-chelating compounds from *Nannocystis exedens* (myxobacteria). Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* 1992, vol. 45, p. 147-50.
34. KUNZE, B.; JANSEN, R.; SASSE, F.; HOFLE, G.; AND REICHENBACH, H. Chondramides A-D, new antifungal and cytostatic depsipeptides from *Chondromyces crocatus* (myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot* 1995, vol. 48, p. 1262–1266.
35. LUNSDORF, H.; AND REINCHENBACH. Ultrastructural details of the apparatus of gliding motility of *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales). *J. Gen Microbiol* 1989, vol. 135, p. 1633-1641.
36. MARTIN, K. J.; BULL, C.T. Novel primers for detection and quantification of *Myxococcus* species in situ. *Molecular Ecology Notes* 2006, vol.6, p. 773–775.

37. MASSON, P.J. AND GUESPIN-MICHEL, J.F. An extracellular blood-anticoagulant glycopeptide produced exclusively during vegetative growth by *Myxococcus xanthus* and other Myxobacteria is not co-regulated with other extracellular macromolecules. *J. Gen. Microbiol.* 1988, vol. 134, n° 3, p. 801-806.
  
38. MENNE, B.; AND RUCKERT, G. Myxobakterien (Myxobacterales) in Hohlensedimenten des Hagengebirges (Nordliche Kalkalpen). *Die Hohle* 1988, vol. 39, p. 120–131.
  
39. McCURDY, H. D. A method for the isolation of myxobacteria in pure culture. *Can. J. Microbiol.* 1963, vol. 16, p. 1453–1461.
  
40. McCURDY, H.D. Studies on the taxonomy of the Myxobacterales. I. Record of Canadian isolates and survey of methods. *Can J Microbiol.* 1969, vol. 15, p. 1453–1461.
  
41. MC BRIDE, M.J. AND ZUSMAN, D.R. Trehalose accumulation in vegetative cells and myxospores of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* 1989, vol. 171, p. 6383–6386.
  
42. MC VITTIE, ANNE; FRANCES, MESSIK AND STANLEY A. ZAHLER. Developmental biology of *Myxococcus*. *J. Bacteriol.* 1962, vol. 84, p. 546-551.
  
43. MIYASHIRO, S; YAMANAKA, S; TAKAYAMA S; SHIBAI, H. Novel macrocyclic antibiotics Megovalicins A,B,C,D,G and H:I. Screening of antibiotics-producing myxobacteria and production of Megovalicins. *J. Antibiotic.* 1988, vol. 41, p. 433 - 438.
  
44. NOREN, BORGE AND KENNETH, B. RAPER. Antibiotic activity of myxobacteria in relation to the bacteriolytic capacity. *J. Bacteriol.* 1962, vol. 84, p. 157-162.
  
45. OKA, M; OHKUMA, H.; KAMEI, H.; KONISHI, M.; OKI, T.; KAWAGUCHI, H. Glidobactins D, E, F, G and H; minor components of the antitumor antibiotic glidobactin. *J Antibiot.* 1988, vol. 41, p. 1906 - 1909.

46. PETERSON, J.E. Isolation, cultivation and maintenance of the myxobacteria. In NORRIS, J.R. *Methods in Microbiology*. Vol 3. Academic Press. London-New York. 1969, pp. 185-209.
47. PLAGA, W.; STAMM, I., and SCHAIRER, H.U. Intercellular signaling in *Stigmatella aurantiaca*: purification and characterization of stigmolone, a myxobacterial pheromone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, vol. 95, p. 11263–11267.
48. RAMIREZ SALDAÑA, Y. 1991. Aislamiento de Myxobacterias por cuatro métodos distintos a partir de suelos de cultivo y corteza. Tesis para optar el grado de Biólogo. U.N.M.S.M. Lima pp 45
49. REICHENBACH, H. & DWORKIN, M. (1992) The myxobacteria. In *The Prokaryotes* (Balows, A., TruÈper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. & Schleifer, K.-H., eds), pp. 3416-3487. Springer, New York, USA.
50. REICHENBACH, H., AND HOFLE, G. 1998. Myxobacteria as producers of secondary metabolites. In *Drug Discovery from Nature*. Grabley, S., and Thiericke, R. Eds Berlin: Springer-Verlag, pp 149-179.
51. REICHENBACH, HANS. Minireview The ecology of the myxobacteria. *Environmental Microbiology* 1999, vol. 1, n° 1, p. 15–21.
52. REICHENBACH, HANS. 2005. Myxococcales. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2da. Edicion. Volumen 2 (The proteobacteria). PP: 1059-1144.
53. ROLF, JANSEN; HERBERT IRSCHIK, REICHENBACH AND GERHARD HOEFLE. Antibiotics from gliding bacteria. Coralopyronin A, B and C: 3 novel antibiotics from *Coralococcus coralloides*, Ccc 127 (Myxobacterales). *Liebigs Ann. Chem.* 1985, vol. 14, p. 822-836.
54. ROSENBERG EUGENE, KELLER KENNETH H. AND DEORKIN MARTIN. Cell density-dependent Growth of *Myxococcus xanthus* on casein. *J. Bacteriology* 1977, vol. 129, p. 770-777.

55. RUCKERT, G. Myxobacteria from Antarctic soils. *Biol Fert Soils* 1985, vol. 1, p. 15–216.
56. RUIZ, C.; SANCHEZ, J.J.; RODRIGUEZ, C. AND. RAMOS-CORMEZANA, A. Isolation and characterization of myxobacteria in soils from Granada. *Folia Microbiol.* 1987, vol. 32, p. 431-433.
57. SABADOS-SARIC, A. Myxobacteria in different types of soils in Yugoslavia. *Yugoslavenska Akademija Znanosti I Umjetnosti* 1957, vol. 312, p. 5–29.
58. SASSE, F.; BOHLENDORF, B.; HERRMANN, M.; KUNZE, B.; FORCHE, E.; STEINMETZ, H.; HOFLE, G.; REICHENBACH, H. Melithiazols, new beta-methoxyacrylate inhibitors of the respiratory chain isolated from myxobacteria. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* 1999, vol. 52, p. 721 – 729.
59. SASSE, F.; STEINMETZ, H.; SCHUPP, T.; PETERSEN, F.; MEMMERT, K.; HOFMANN, H.; HEUSSER, C.; BRINKMANN, V.; VON MATT, P.; HÖFLE, G.; REICHENBACH, H. Argyrins, immunosuppressive cyclic peptides from myxobacteria. I. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot* 2002, vol. 55, p. 543-551
60. SASSE F, LEIBOLD T, KUNZE B, HOFLE G, REICHENBACH H. 2003. Cyrmenins, new beta-methoxyacrylate inhibitors of the electron transport. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. 1: *J Antibiot (Tokyo)* 2003, vol. 56, n° 10, p. 827-31.
61. SCHNEIKER S, PERLOVA O, KAISER O, GERTH K, ALICI A, ALTMAYER MO, BARTELS D, BEKEL T, BEYER S, BODE E, BODE HB, BOLTEN CJ, CHOUDHURI JV, DOSS S, ELNAKADY YA, FRANK B, GAIGALAT L, GOESMANN A, GROEGER C, GROSS F, JELSBK L, JELSBK L, KALINOWSKI J, KEGLER C, KNAUBER T, KONIETZNY S, KOPP M, KRAUSE L, KRUG D, LINKE B, MAHMUD T, MARTINEZ-ARIAS R, MCHARDY AC, MERAI M, MEYER F, MORMANN S, MUÑOZ-DORADO J, PEREZ J, PRADELLA S, RACHID S, RADDATZ G, ROSENAU F, RÜCKERT C, SASSE F, SCHARFE M, SCHUSTER SC, SUEN G, TREUNER-LANGE A, VELICER GJ, VORHÖLTER FJ, WEISSMAN KJ, WELCH RD, WENZEL SC,

- WHITWORTH DE WILHELM S, WITTMANN C, BLÖCKER H, PÜHLER A, MÜLLER R. Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *Nature Biotechnolog.* 2007, vol. 25, p. 1281–1289.
62. SEHDEV, P.R. & DHALA, S.A. Larvicidal activity of *Myxococcus fulvus* NK35 on larvae of *Culex fatigans* and *Aedes aegypti*. *J. Environ. Biology.* 1992, vol. 13, p. 323 - 331.
63. SHIMKETS, L.J. Structural and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol. Rev.* 1990, vol. 54, p. 473–501.
64. SINGH B.N. Myxobacteria in soils and compost, their distribution, number and lytic action on bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 1947, vol.1. p. 1-10.
65. SOZINOVA O, JIANG Y, KAISER D, ALBER M. "A three-dimensional model of myxobacterial aggregation by contact-mediated interactions". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005, vol. 102, p. 11308 - 11312.
66. SPIEGEL, F.W., STEPHENSON, S.L., KELLER, H.W., MOORE, D.L. and CAVENDER, J.C. (2004). Sampling the biodiversity of Mycetozoans. In Mueller, G. M., Bills, G. and Foster, M.S. (eds) *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier Academic Press. Burlington, Massachusetts. USA.
67. STEPHENS, K; HEGEMAN, G; WHITE, D. Pheromone produced by the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *J Bacteriol.* 1982, vol. 149, p. 739–747.
68. WIREMAN J.W. AND M. DWORKIN, Morphogenesis and developmental interactions in myxobacteria. *Science* 1979, vol. 189, p. 516-523.
69. WOLFANG, D. Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiology Reviews* 2000 vol. 24, p. 403–427.
70. WU, B., HAMDY, M., AND HOWE, H. Antimicrobial activity of a myxobacterium against blue-green algae. *Bacteriol Proc* 1968, 1968: 48.



71. JAEYOUNG K., JINWOO C., KYUNGYUN C., AND YONGSUB Y. Isolation and Charaterization of Myxobacteria with Proteolytic Activity *Kor. J. Microbiol. Biotechnol* 2009, vol. 37, n. 3, p.183–188.
72. YU-QING, Z., YUE-ZHONG, L., BING, W., ZHI-HONG, W., CUI-YING, Z., XUN, G., ZHI-JUN, Q., AND YONG Z.. Characteristics and Living Patterns of Marine Myxobacterial Isolates. *Appl Environ. Microbiol.* 2005, vol. 71, n° 6, p. 3331–3336.
73. ZHUKOVA, R.A. Prevalence of aerobic cellulose bacteria in soils of the Kola Peninsula. *Microbiology (Transl Mikrobiolgiya)* 1959, vol. 28, p. 62- 68.
74. ZHUKOVA, R.A. Aerobic cellulose bacteria of northern soils. *Microbiology (Transl Microbiologiya)* 1963, vol. 31, p. 855-860.

## X. ANEXOS

### ANEXO A: Medios de cultivo

1. AGAR AGUA (AA)

CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,1 %
Agar agar	1,5 %
pH 7,2	

2. AGAR STANIER (A-St)

KNO <sub>3</sub>	0,075 %
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,075%
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,02 %
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,01 %
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,02 %
Agar agar	1,5 %
pH 7,2-7,4	

3. MEDIO STANIER MODIFICADO (MSTM)

Agar Stanier  
Discos de papel filtro

4. MEDIO STANIER ALMIDON (MSA) (McCurdy, 1963)

Almidon soluble	0,5 %
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05 %
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,025 %

5. AGAR SINGH (A-S)

Medio Agar agua  
*E. coli* lavadas

6. AGAR MEC (McCurdy, 1963)

Células lavadas de <i>E. coli</i>	100 mg (peso seco) / 100 ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,05 %
NaCl	0,6 %
Agar agar	1,5 %

7. AGAR CASITONE (A-Cy)

Casitone (DIFCO)	0,3 %
Extracto de levadura	0,1 %
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,1 %
Agar agar	1,5 %
pH 7,2	

8. AGAR LEVADURA

Levadura seca	0,5 %
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,1 %
Cianocobalamina	0,5 µg/ml
Agar agar	1,5 %

9. AGAR PELLETS

Agar agua como medio base  
4 a 6 unidades de estiércol de conejo autoclavados (121 °C x 15 min)

10. AGAR PT (A-Pt)

Casitone (DIFCO)	0,4 %
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 %
Extracto de levadura	0,4 %
Agar agar	1,5 %

11. MEDIO K&K

Suelo en forma de lodo

Pellets de conejo

12. SOLUCION ROJO CONGO (R-C) (McCurdy, 1969)

El Rojo Congo al 0,01 % disuelta en agua. Los cultivos vegetativos son Cubiertos con esta solución por un tiempo de 5 – 10 minutos. Esta prueba diferencia a las colonias que captan la solución de las que no.

13. CALDO LURIA (C-L)

Extracto de levadura	0,5 %
Triptona	1,0 %
CINa	0,5 %
pH 7,2	

14. CALDO B.H.I (BHI)

Medio base: BHI	3,7 %
-----------------	-------

15. AGAR IM-1 (IM-1)

KNO <sub>3</sub>	0,075 %
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1 %
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 %
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,01%
FeCl	0,02 %
Celobiosa	0,1 %
Casitone (DIFCO)	0,5 %
Agar agar	1,5 %
Actidione activo	25 µg/L
pH 7,2 – 7,4	
Esterilización a 121 °C por 15 minutos.	

16. MEDIO LIQUIDO CT (Dworkin, 1962)

Casitone (DIFCO)	2 %
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 %
Buffer fosfato de potasio pH 7,2	0,01M

17. AGAR MACCONKEY

Digerido Pancreático de Gelatina	17.0 g
Sales Biliares	1.5g
Digerido Péptico de Tejido Animal	1.5g
Cloruro de Sodio	5.0g
Digerido Pancreático de Caseína	1.5g
Cristal Violeta	0.001g
Lactosa	10.0g
Agar Bacteriológico	13.5g
Rojo Neutro	0.03g
pH 7.1 ± 0.2	

## ANEXO B: Fotos



FIGURA N°2. *Myxococcus fulvus*, cepa V10B a 30X de aumento.

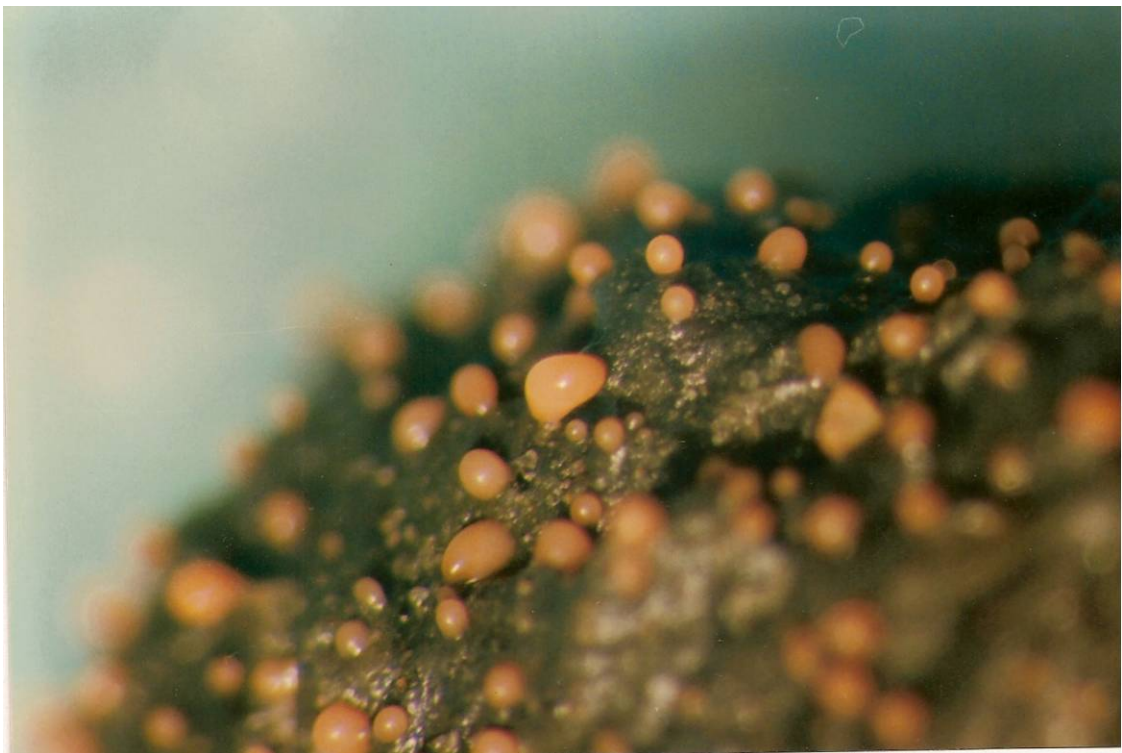


FIGURA N°3. *Myxococcus Xanthus*, cepa J8A a 10X de aumento.

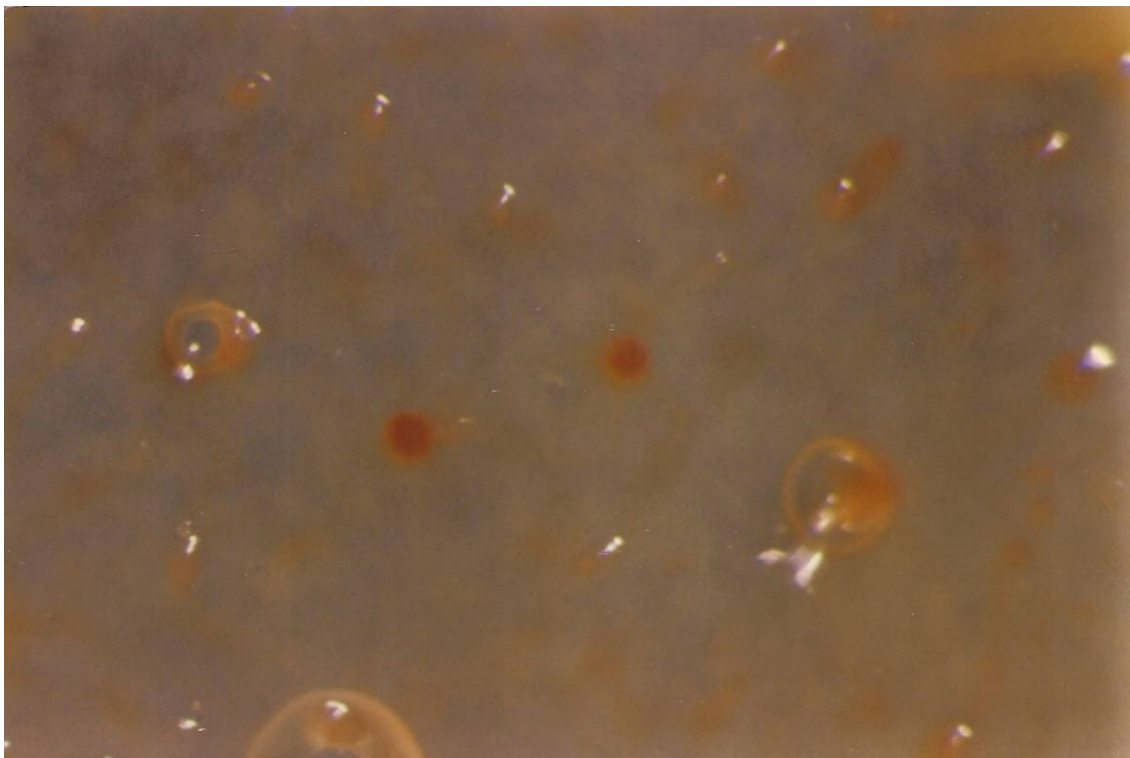


FIGURA N°4. *Myxococcus xanthus* en fase vegetativa sobre Agar Pt.  
A 10x de aumento

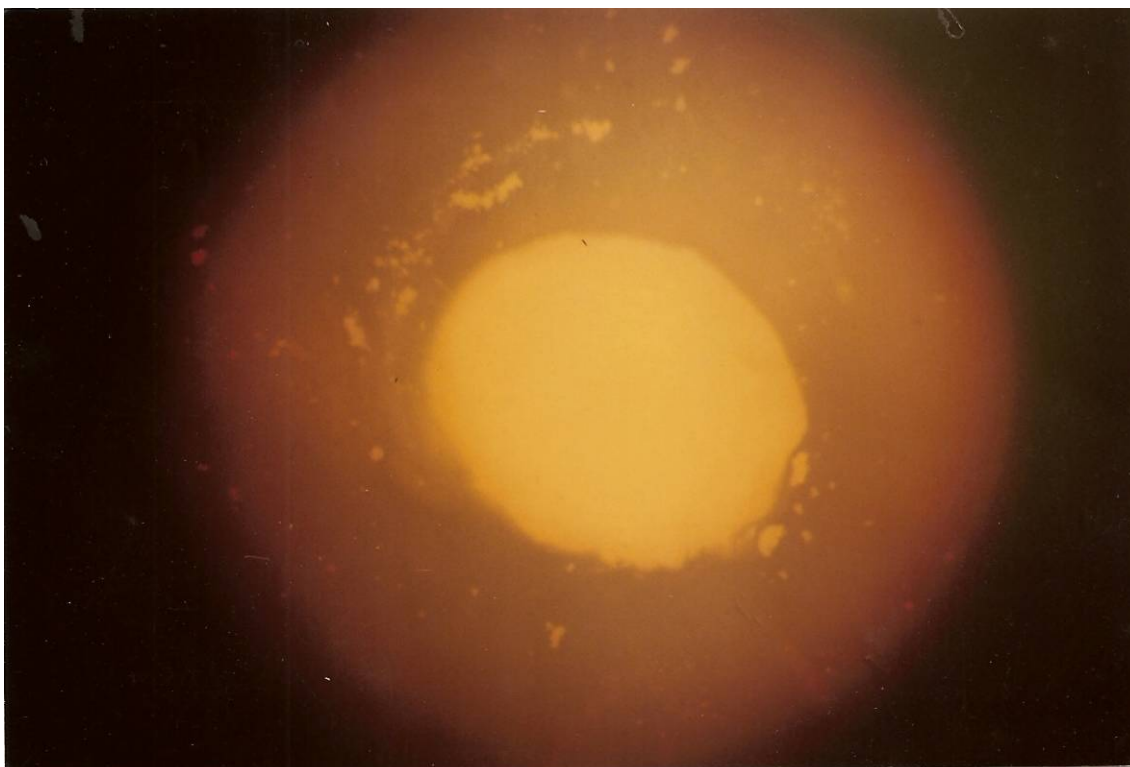


FIGURA N°5. *Myxococcus xanthus* en fase vegetativa sobre Agar Levadura, se observa el consumo de levadura en el lugar donde se sembró la cepa. A 10x de aumento.



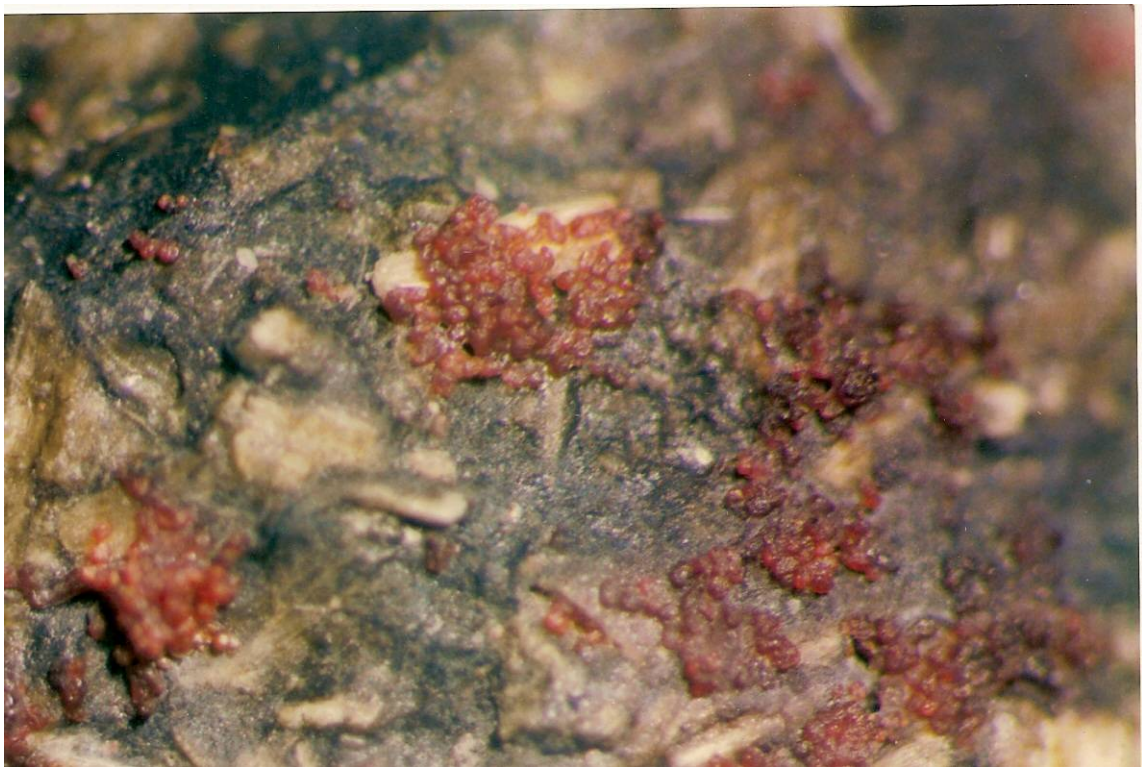


FIGURA N°6. *Cystobacter* sp sobre estiércol de conejo, aislamiento primario.  
A 20X de aumento.



FIGURA N°7. *Cystobacter* sp sobre estiércol de conejo, aislamiento primario.  
A 20X de aumento.





FIGURA N°8. *Cystobacter* sp sobre estiércol de conejo. A 20X de aumento.

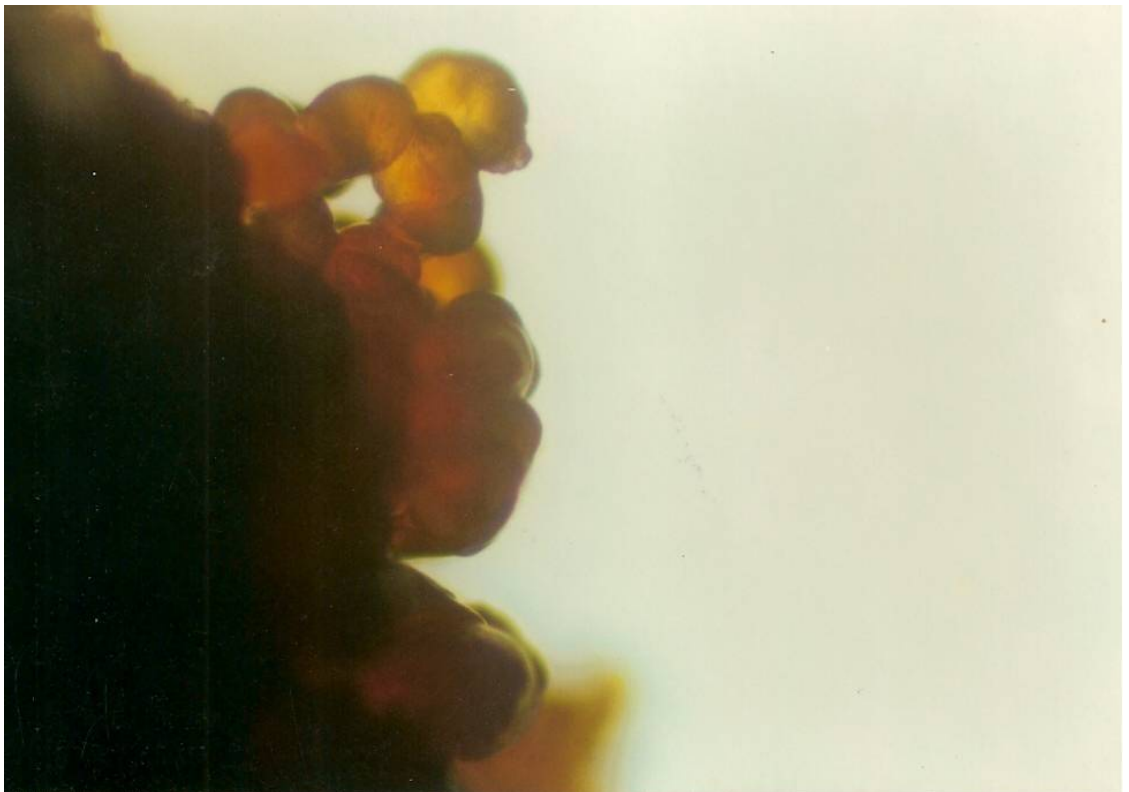


FIGURA N°9. *Cystobacter* sp sobre estiércol de conejo. A 30x de aumento.



FIGURA N°10. *Myxococcus fulvus*, crecimiento de cuerpos fructificantes.  
A 30X de aumento.



FIGURA N°11. *Myxococcus fulvus*, crecimiento de cuerpos fructificantes.  
A 50X de aumento.

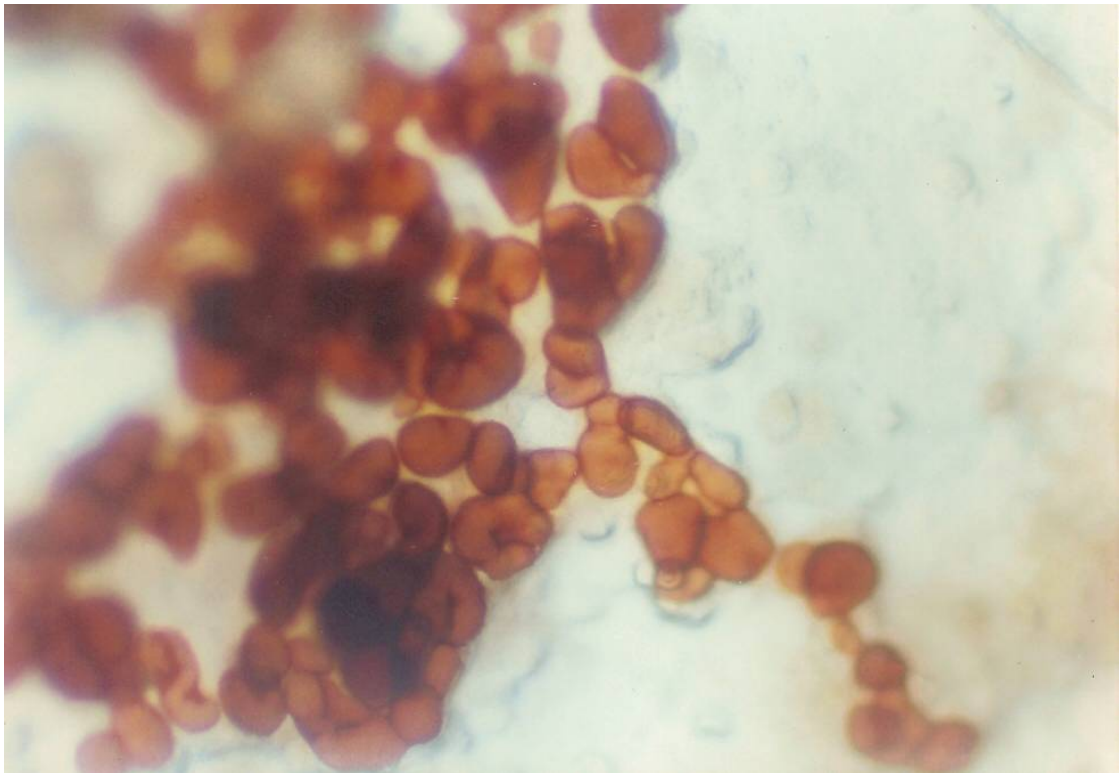


FIGURA N°12. Mixosporas de *Cystobacter* sp. A 100X de aumento.

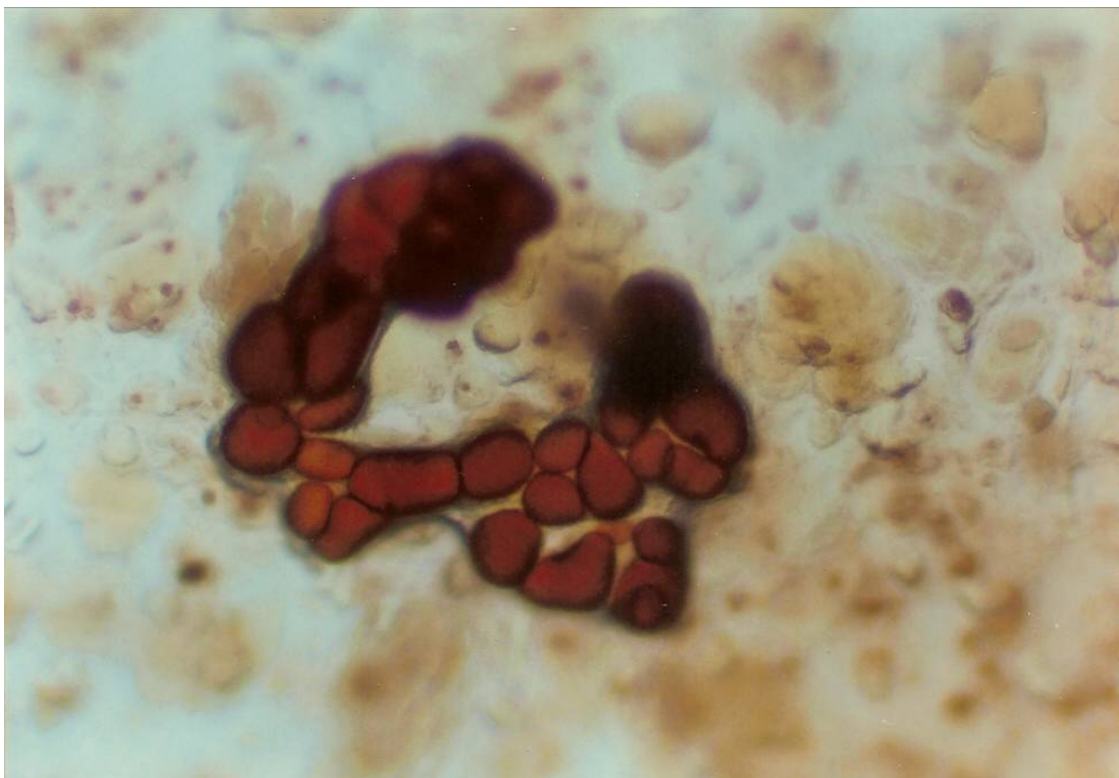


FIGURA N°13. Mixosporas de *Myxococcus xanthus*. A 100X de aumento.



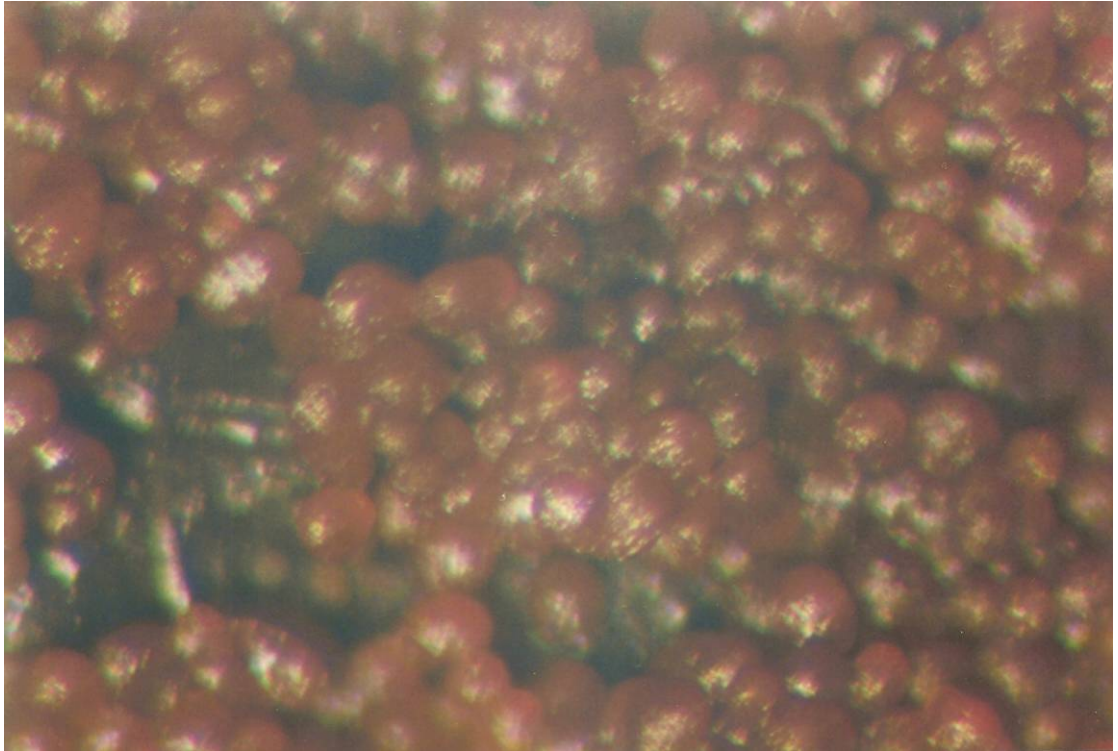


FIGURA N°14. *Cystobacter* sp. A 20X de aumento.

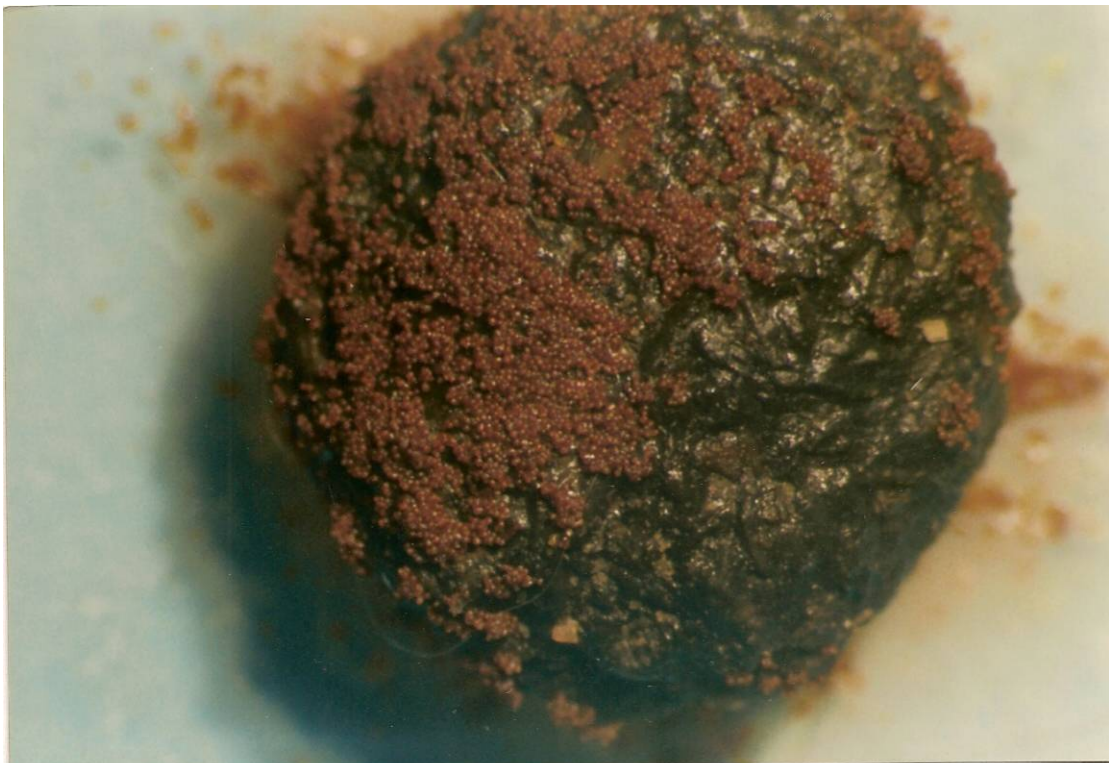


FIGURA N°15. *Cystobacter* sp en etapa de purificación sobre Agar Pellets.  
A 5X de aumento.

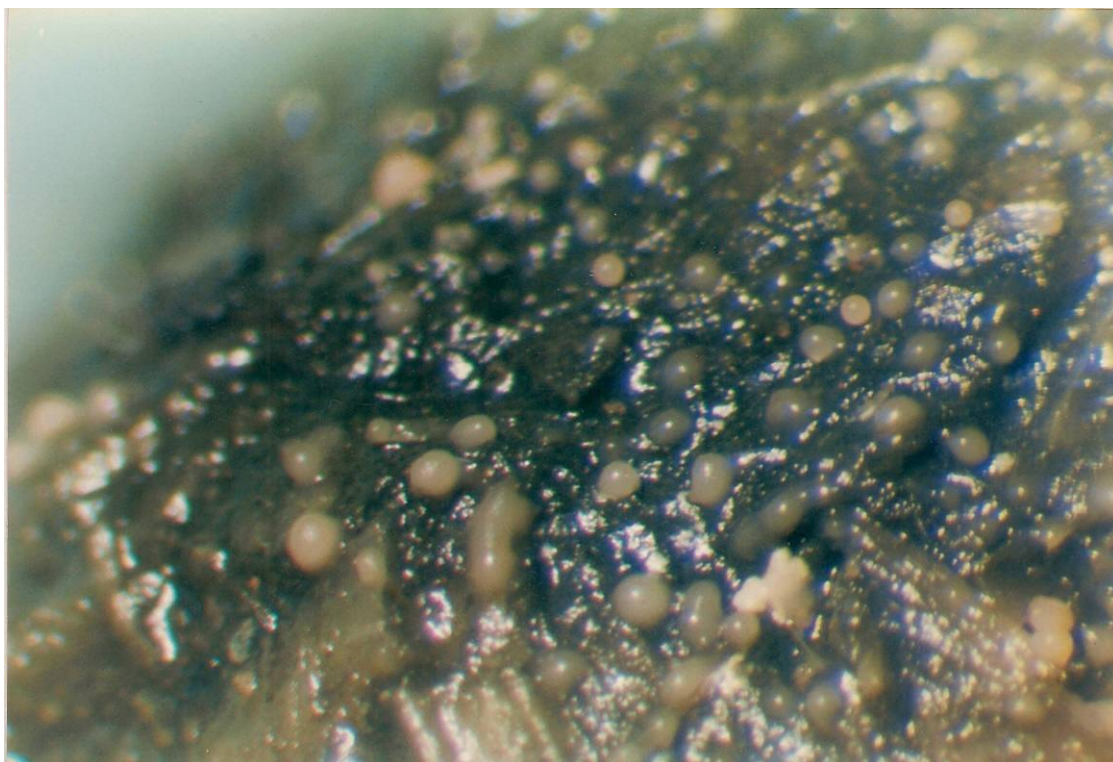


FIGURA N°16. *Myxococcus* sp. A 10X de aumento.

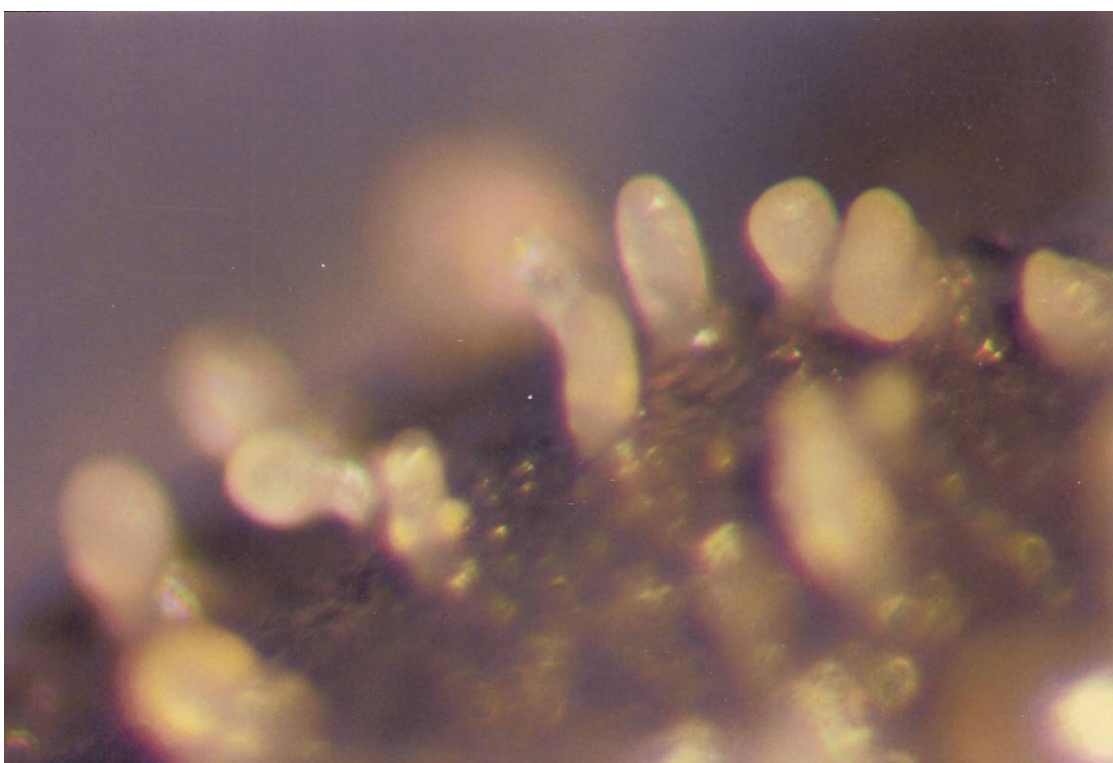


FIGURA N°17. *Myxococcus virescens* sobre estiércol de conejo.  
A 20x de aumento.



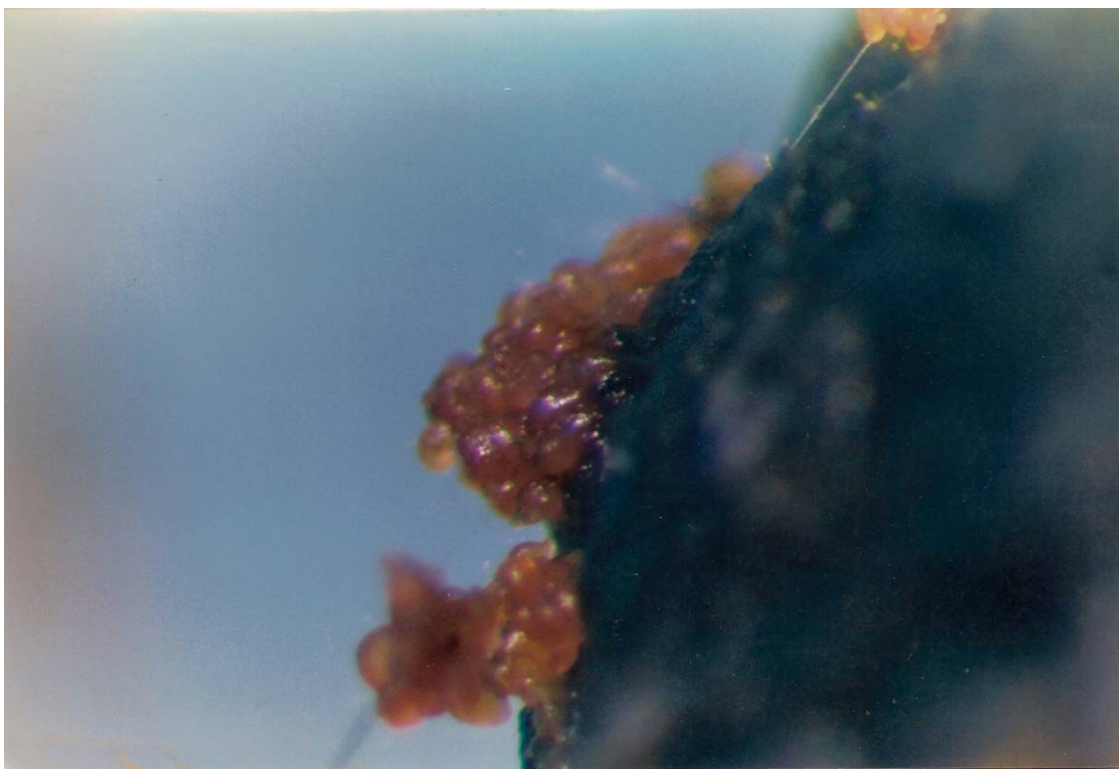


FIGURA N°18. *Stigmatella* sp. A 10X de aumento.



FIGURA N°19. *Myxococcus virescens*. A 10X de aumento.

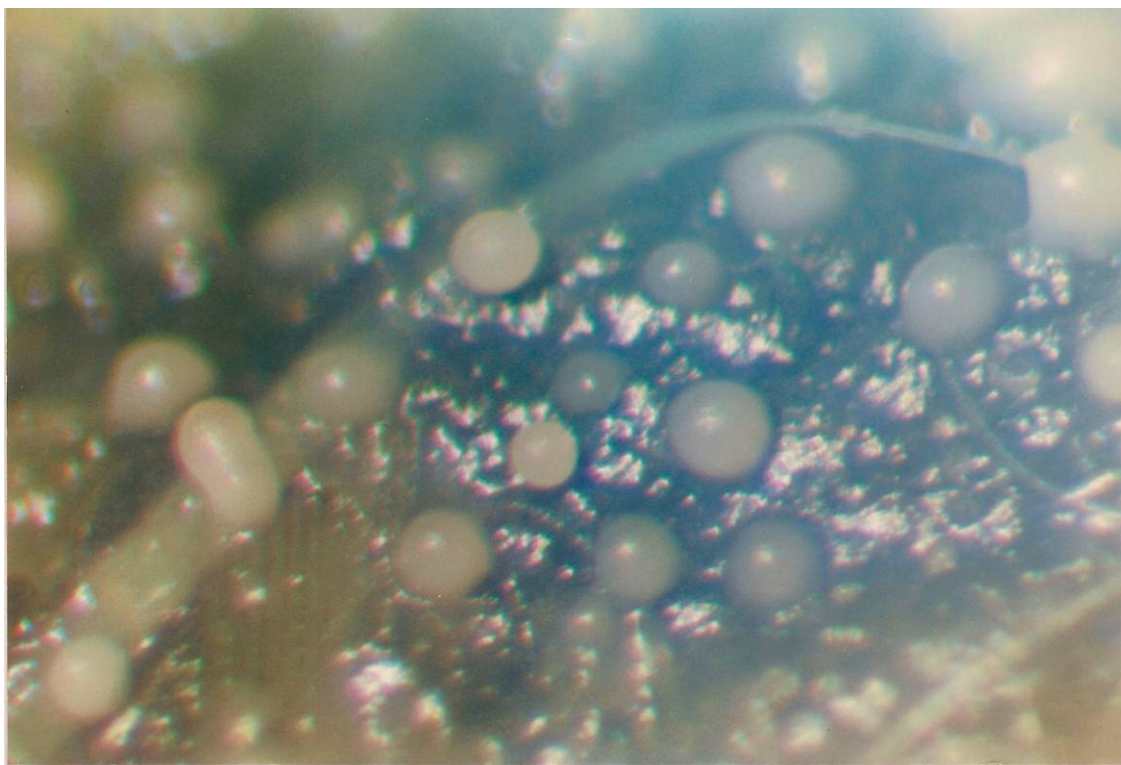


FIGURA N°20. *Myxococcus fulvus*. A 10X de aumento.

Anexo C: Diagrama de flujo de la metodología utilizada

